АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVII. ВЫП. 6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1948

МИКРОБИОЛОГИЯ

Главный редактор академик Б. Л. Исаченко

Зам. главного редактора чл.-корр. Академии Наук СССР
А. А. Имшенецкий

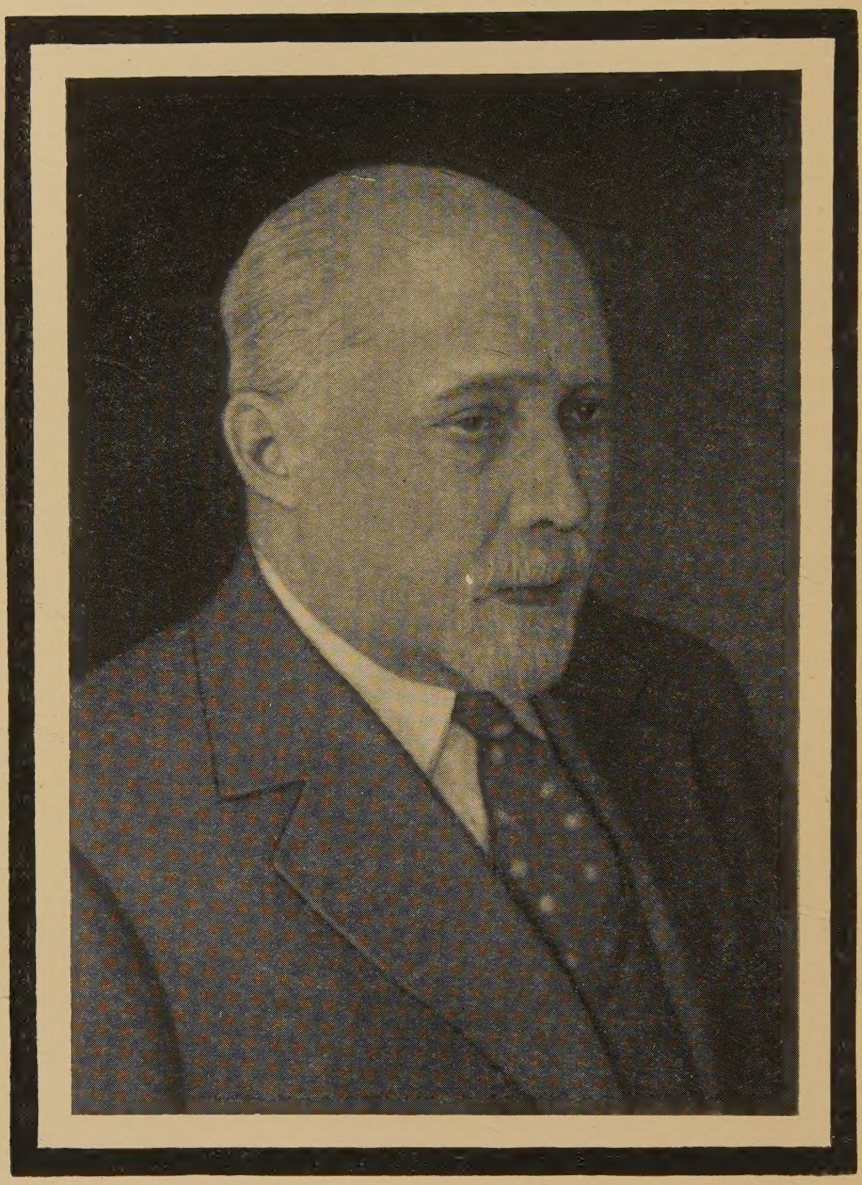
Секретарь Я. И. Раутенштейн,

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников,
В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ" ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакции журнала «Микробиология»



1871~1948

БОРИС ЛАВРЕНТЬЕВИЧ ИСАЧЕНКО

Советская наука понесла тяжелую утрату — скончался выдающийся русский ученый главный редактор журнала «Микробиология» — академик Борис Лаврентьевич Исаченко.

В лице Бориса Лаврентьевича мы потеряли большого ученого, посвятившего свыше 50 лет своей жизни развитию отечественной микробиологии и ботаники. Начав свою научную деятельность еще в прошлом столетии, Борис Лаврентьевич обогатил науку многими исключительно ценными работами. Диапазон его научных интересов был исключительно широк. Им проводились исследования в области общей и сельскохозяйственной микробиологии, фитопатологии и физиологии растений. Его имя хорошо известно ботаникам и агрономам, как имя ученого, впервые у нас в стране начавшего углубленные работы по семеноведению.

Однако наибольший интерес представляют его работы по геологической и водной микробиологии. Располагая богатейшим материалом, накопленным в ряде морских экспедиций, Борис Лаврентьевич создал и возглавил совершенно новую отрасль микробиологии — морскую микробиологию. Все иностранные ученые вынуждены признать, что морская микробиология зародилась и сформировалась у нас, и этому мы обязаны покойному Борису Лаврентьевичу. Большинство его экспедиций было проведено в арктических морях, и они, несомненно, способствовали освоению Арктики. Изданная им в 1914 г. классическая монография «Исследования над бактериями Северного ледовитого океана» вышла гораздо раньше, чем появились иностранные монографии по этому вопросу. Она стала настольной книгой для всех работающих в области изучения биологической продуктивности морей.

Внимание Бориса Лаврентьевича всегда привлекала роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе. Особенно детально он разрабатывал проблемы, связанные с образованием и разложением горючих и других полезных ископаемых. Им изучались процессы биогенного образования отложений серы, кальция, железа и других элементов. Исследования Бориса Лаврентьевича в области геологической микробиологии получили исключительно широкую известность. Некоторые из них способствовали развитию новых методов разведки на нефть и газы, другие вскрыли сущность биохимических процессов, происходящих при образовании лечебных грязей.

Ряд работ Бориса Лаврентьевича неразрывно связан с практическими задачами сельского хозяйства или промышленности. Так, он был одним из первых русских исследователей, поднявших еще в конце прошлого столетия вопрос об использовании азотфиксаторов для удобрения почвы. Большое внимание им было уделено бактериальному методу истребления грызунов, вопросам самонагревания зерна и т. д. Не будет преувеличением сказать, что именно благодаря деятельности Бориса Лаврентьевича, возглавившего первую у нас в стране лабора-

торию по оценке семенного материала, в нашем сельском хозяйстве стали уделять должное внимание вопросам семеноведения.

Обладая большим административным опытом, Борис Лаврентьевич значительный период своей жизни совмещал научно-исследовательскую деятельность с научно-организационной работой. С 1917 по 1930 г. он был директором Главного ботанического сада, некоторый период был ректором Ленинградского сельскохозяйственного института, затем заведующим Отделом общей микробиологии ВИЭМ, а с 1937 г.— директором Института микробиологии Академии Наук СССР.

За 40 лет своей педагогической деятельности Борис Лаврентьевич, как профессор Ленинградского университета и Ленинградского сельскохозяйственного института, подготовил большое число специалистов.

Многолетняя разносторонняя деятельность Бориса Лаврентьевича делает понятным, почему его имя столь популярно среди широких кругов научных работников. Его именем назван остров в Карском море и новые виды лишайников, водорослей и бактерий. Как патриот своей Родины, Борис Лаврентьевич неустанно трудился в дни Великой отечественной войны и в условиях эвакуации обеспечил бесперебойную работу Института микробиологии, выполнявшего ряд ответственных работ. Его деятельность получила высокую оценку Правительства, он был награжден Орденом Ленина, Трудового Красного Знамени и медалями.

В развитии отечественной микробиологии бесспорно может быть установлена преемственная связь между тремя крупнейшими учеными в этой области науки: Виноградским, Омелянским, Исаченко. Стремление вскрыть роль микроорганизмов в процессах возникновения и разрушения различных веществ в природе характеризует основное направление общей микробиологии. Борис Лаврентьевич был представителем именно этого направления — он был главой советской общей микробиологии.

Тяжело сознавать, что от нас навсегда ушел большой ученый, неутомимый исследователь, прекрасный человек, жизненный путь которого отмечен самоотверженным выполнением своего долга перед наукой и Родиной.

Светлая память о Борисе Лаврентьевиче навсегда сохранится в сердцах его многочисленных учеников и всех знавших его.

РЕДАКЦИЯ

ОПИСАНИЕ НОВОГО ВИДА БАКТЕРИИ BAC. LONGISSIMUS

Е. Н. Мишустин и *Е. З. Теппер*

Описываемый организм был выделен из парниковой почвы, весьма богатой подвижными формами азота.

За способность образовывать длинные нити мы назвали выделенную бактерию Bac. longissimus. Ее описание дается ниже.

Морфология. Палочка с округленными концами, дающая длинные, с трудом распадающиеся цепочки. Длина нитей доходит до 1,0 мм и более. Ширина клеток равна 1,8—2,0 μ, при длине 8—10 μ и большей. Перегородки между клетками плохо видны без окраски, почему нить производит впечатление одноклеточной. Склонность образовывать длинные нити резко проявляется на крахмало-аммиачном агаре, агаризованных средах Чапека и Боннера, МПА и МПБ.

Иногда при старении культуры часть бактериальных нитей, не давших спор, распадается на довольно длинные обрывки и отдельные уродливо раздутые клетки, которые имеют сильную грануляцию. Микрохимические реакции позволяют обнаружить в клетке волютин. Жира установить не удается. Окраска по Гимза показывает наличие диспергированного ядерного вещества. Окраска по Граму положительная.

Спорообразование. Споры овальной формы. Их длина колеблется в пределах 1,2—2,0 μ, а ширина в пределах 0,5—0,8 μ. Положение спор центральное. Споры образуются скорее при обильном доступе воздуха. В свежей питательной среде спора набухает, постепенно удлиняется и превращается в нормальную палочку.

Подвижность. Клетки неподвижные и жгутов не имеют.

Рост на МПА. Развитие слабое. Рост при 25—30° появляется через 4 суток. Колонии слабо лопастные, белые, матовые. Их диаметр равен 1,5—2 мм. При слабом увеличении видно, что колонии сформированы из нитей. Нитевидная структура колоний особенно хорошо заметна на их периферии. При посеве уколом в МПА, разлитый столбиком, отмечается узелковидный рост по линии штриха.

Рост на МПЖ. Рост медленный, колонии тождественны образующимся на МПА. Желатина не разжижается.

Рост на агаризованной аммиачно-сахарной среде. Рост обильный. Колонии матовые, белые, круглые, выпуклые, тестообразные. Колонии кажутся состоящими из концентрических колец, что является следствием структуры колоний, формирующихся из длинных нитей. Одновременно в колонии отмечается и наличие радиальной исчерченности. Края волнистые, резко очерченные.

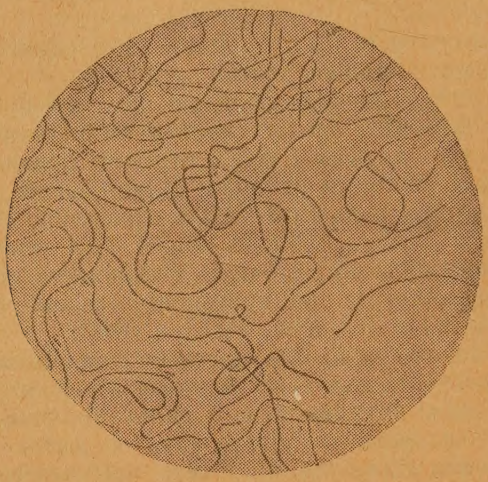
При микроскопировании края колонии хорошо видны слагающие ее нитевидные элементы. Нити в колонии идут зигзагами и отдельные из них отходят довольно далеко в среду. При старении колонии ее бугристый характер исчезает и профиль становится кратерообразным. На скошенном агаре штрих получается широким. Края его ровные, резко очерченные. При прикосновении к колонии иглой тянется слизистая масса, состоящая из длинных бактериальных нитей.

На картофеле — выпуклый, белый, слегка сероватый налет сочной консистенции. Поверхность налета матовая. Края штриха гладкие. Масса, из которой слагается колония, тянущаяся.

Рост на МПБ. Рост появляется при температуре 25—30° на 4-е сутки в виде хлопьевидного белого осадка, постепенно нарастающего на дне пробирки. Со дна пробирки в среду начинают постепенно нарастать довольно длинные тяжи

Рост на молоке. Рост обнаруживается на 4—5-е сутки после заражения в виде слабого кольца на поверхности среды.

Температура развития. Минимальная температура лежит ниже 4°. При этой температуре слабый рост отмечается на 10-й день. Зона интенсивного роста находится в пределах 28—36°. Выше 36° развитие замедляется и при температуре 45° прекращается совершенно.



Культура Bac. longissimus nov. sp. ×400

Устойчивость спор к нагреванию. Большинство спор погибает при 100° за 30 минут. Отдельные споры выдерживают кипячение и в продолжение большего времени, но не более одного часа.

По отношению к кислороду. Микроб должен быть охарактеризован, как строгий аэроб.

Отношение к кислотности среды. Оптимум лежит в пределах pH = 6,8—7,0, при pH = 5,0 развитие прекращается совершенно.

Источники азота. Хорошо усваивается азот аммиачных соединений, нитратов и аспарагина. На пептоне развитие идет слабее, на альбумине роста не наблюдается совершенно.

Источники углерода. В качестве источника углерода могут употребляться различные сахара (глюкоза, мальтоза, сахароза, молочный сахар). Среда при этом подкисляется. Декстрин и крахмал ассимилируются хорошо. На арабинозе, солях винной и уксусной кислот развитие не наблюдается. Целлюлоза не разлагается.

На усвояемых углеводах накапливается в весьма небольших количествах молочная кислота (положительная реакция Уффельмана). Наличие других органических кислот установить не удалось. Выделения газа при ассимиляции углеводов не отмечается.

Рисунок дает примерное представление об описанной бактерии.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР и
Кафедра физиологии растений
и микробиологии Московской
сельскохозяйственной Академии
им. Тимирязева

Получено 16.I.1948

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СУЛЬФАТОВ ФАКУЛЬТАТИВНО-АЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Л. Д. Штурм

Как сообщалось ранее [3], из глубоководных илов Черного моря было выделено два микроорганизма, обладающих способностью развиваться в аэробных условиях в отсутствие сульфатов и восстанавливать сульфаты в анаэробных условиях,— Pseudomonas Zelinskii n. sp.— основная форма и ее штамм А. Однако длительное культивирование микроорганизмов в аэробных условиях без сульфатов на обычных МП-средах приводит к потере способности восстанавливать сульфаты. Было установлено, что восстановление сульфатов не происходит, если синтетические среды с сульфатами заражать непосредственно культурами, выросшими на МП-средах. Эта утраченная способность может быть им возвращена, и тогда культура способна снова энергично восстанавливать сульфаты, как это видно из приводимых ниже данных.

Требуется постепенное изменение условий культивирования при переходе микроорганизма от развития при доступе воздуха к развитию анаэробному. В нашей работе это достигалось применением «двойной среды».

Методика

Для изучения процесса восстановления сульфатов мы пользовались средами Пельш [1] и Таусон [2], введя в них значительные изменения. Состав среды I: водопроводной воды — 1 000 мл, $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ — 20 г, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 10 г, NH_4Cl — 3 г, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1 г, KCl — 0,02 г, $FeSO_4$ — 0,02 г, NaCl — 30 г. Молочнокислый натрий 10—15 г. Следы сернокислых солей цинка, марганца, кобальта, магния; pH среды = 7,2—7,4. Состав среды II: водопроводной воды — 1 000 мл, $(NH_4)_2SO_4$ — 4 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1 г, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,5 г, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ — 0,5 г, K_2HPO_4 — 0,5 г, NaCl — 1—3%. Молочнокислое железо — 4 г; pH = 7,2—7,4.

Для приготовления двойной среды в нижнюю часть пробирки с косым МПА наливают 0,5—1 мл среды II. В этих условиях культура могла развиваться одновременно аэробно на поверхности агара и анаэробно в среде с сульфатами

Для того чтобы выяснить, могут ли культуры, полученные на обычных МП-средах при доступе воздуха, развиваться и восстанавливать сульфаты в анаэробных условиях, проводились следующие опыты.

Различные жидкие и плотные среды с сульфатами заражали культурами исследованных микроорганизмов на МП-средах и вели испытания как в аэробных условиях, так и в анаэробных.

Употреблялись следующие среды:

1. Синтетические жидкие и плотные среды с сульфатами (среда I и II с 1% NaCl).
2. Среды смешанного типа (среда I или II с прибавлением МПБ).
3. Обычные МП-среды с сульфатами.
4. Двойная среда.

Культивирование в двойной среде проводилось при доступе воздуха, на всех других средах без доступа воздуха.

В первом случае культуры не развивались совсем. Во втором и в третьем наблюдался очень слабый рост, но восстановления сульфатов не происходило. В четвертом случае обычно появлялся рост сначала на поверхности агара (через 12—24 часа), затем в среде выпадал осадок сернистого железа и постепенно чернела вся среда (в контрольных посевах на двойную среду без сульфатов, с раствором уксуснокислого свинца, почернение не наблюдалось). Слабое потемнение отмечено лишь в старых культурах в осадке бактериальной массы.

Как показали опыты, Ps. Zelinskii n. sp. обладал способностью восстанавливать сульфаты после многократного и длительного пассирования через МП-среды (табл. 1). Так, например, заражение двойной среды культурой с МПА (690), подвергшейся предварительно шестикратному последовательному выделению из отдельных колоний и десятикратному последовательному пассированию через МПБ, вызывало развитие процесса восстановления сульфатов в двойной среде через сутки и менее (706, 710). Дальнейшее пассирование через МП-среды приводит к ослаблению сульфатвосстанавливающей способности микроорганизма (888, 848, 889 и др.). Однако эта способность может быть восстановлена, как будет видно из дальнейшего.

Таблица 1

Восстановление сульфатов в двойной среде культур Ps. Zelinskii n. sp. после предварительного проведения через МП-среды

Культуры для заражения*			Схема предварительного пассирования через			Суммарное время предварит. культивирования на МП-средах, в днях	№ культуры в двойной среде	Начало восстановления сульфатов, в сутках
			МПА	МПБ	МПА			
№ культуры	Среда	возраст в сутках	колич. последоват. разливок***	колич. последоват. пассажей	колич. последоват. разливок с МПБ***			
578	МПА	2	1	—	—	2	584	2
591	»	2	4	—	—	7	592	2
600	»	1	5	—	—	11	618	1
601	»	1	5	—	—	11	619	1
614	»	1	6	—	—	12	620	1
636	»	2	8	—	—	15	656	1
690	»	3	6	10	—	38	706	1
690	»	6	6	10	—	41	710	1
833	»	15	6	10	4	109	888**	8
841	»	3	6	10	6	99	848**	2
841	»	13	6	10	6	109	889**	3
785	МПБ	3	7	9	—	61	799	2
843	»	12	6	10	3	96	887**	3
592	Двойная	103	5	—	—	7	915	1
848	»	6	6	10	6	96	883**	9
794	Синт. среда II	52	6	—	—	12	914	1
693	» » II	62	6	—	—	12	917	1

Примечание. * Исходная культура для разливок на МПА была получена заражением среды II культурой на среде Baars (см. Штурм [3]).
** В указанных культурах восстановление сульфатов протекало слабо.
*** Посевы из отдельных колоний.

Из табл. 1 можно также видеть, что возраст культуры инокулята не оказывает влияния на развитие процесса восстановления сульфатов в двойной среде (690, 841). Большее значение имеет, повидимому, общая

продолжительность времени культивирования на МП-средах. Ослабленный процесс, как правило, наблюдается при заражении трехмесячными и более старыми культурами (888, 848, 889, 883).

Что касается штамма А, то, как указано ранее [3], микроорганизм быстро вырождается на МП-средах. Быстрое восстановление сульфатов в двойной среде дали только культуры, полученные в результате одного из четырех последовательных выделений из колоний на МПА. Культуры, полученные путем 7—9 последовательных посевов из отдельных колоний или путем 7—8-кратного пассирования через МПБ, вызывали слабый процесс восстановления сульфатов в двойной среде, наступавший лишь на 7—12-е сутки. Ослабление способности восстановления сульфатов связано, повидимому, также с длительностью культивирования на МП-средах.

Для выяснения интенсивности процесса восстановления сульфатов вызываемого исследуемыми микроорганизмами, жидкие среды I и II заражались культурами с двойной средой (культивирование в доверху заполненных склянках).

Восстановление сульфатов под влиянием Ps. Zelinskii n. sp. обычно наступало на 5—10-е сутки. Последующие посевы на эти среды давали более быстрое развитие (на вторые, третьи сутки).

Результаты опытов приведены в табл. 2. Испытывались культуры второго и третьего последовательного посева на среду I и II.

Из табл. 2 видно, что Ps. Zelinskii n. sp. энергично восстанавливает сульфаты на среде I. Количество образовавшегося сероводорода составляло от 544,4 мг/л до 853,4 (939, 732); на среде II — от 113,2 до 425,0 мг/л (933, 988 и 995).

Процесс восстановления сульфатов под влиянием микроорганизмов выражают следующими схематическими уравнениями:

1) $2C_3H_5O_3Na + 3MgSO_4 = 3MgCO_3 + Na_2CO_3 + 2CO_2 + 2H_2O + 3H_2S$
(уравнение van Delden [6]);

2) $2C_3H_5O_3Na + MgSO_4 = 2C_2H_3O_2Na + CO_2 + MgCO_3 + H_2S + H_2O$
(уравнение Baars [4]).

Как видно из табл. 2, во всех исследованных культурах количество обнаруженного сероводорода по отношению к количеству потребленной молочной кислоты очень близко, а в одном случае идентично с теоретическим требованием уравнения Baars.

Таблица 2

Образование сероводорода и потребление молочной кислоты* Ps. Zelinskii n. sp. на среде I и II

№ культуры	Среда	Возраст в днях	Потребление молочной кислоты		Образование сероводорода		H_2S мМ/л согласно уравнению	
			мг/л	мМ/л	мг/л	мМ/л	Baars	v. Delden
933	II	60	1 942,1	21,6	285,6	8,4	10,8	32,4
988а	II	46	1 862,5	20,7	425,0	12.5	10,3	30,9
988б	II	46	1 862,5	20,7	299,2	8,8	10,3	30,9
988в	II	46	1 862.5	20,7	275,4	8,1	10,3	30,9
955	II	10	514,8	5,7	113,2	3,3	2,8	8,4
939	I	57	3 049,8	33,9	544,4	16,0	16,9	50,7
732а	I	105	4 462,4	49,6	843,2	24,8	24,8	74,4
732б	I	105	4 738,0	52,6	853,4	25,1	26,3	78,9

* Молочная кислота определялась по методу Fridmann [5].

Восстановление сульфатов под влиянием Ps. Zelinskii n. sp. наблюдалось также на средах с источниками углерода в виде кальциевых или натриевых солей кислот (щавелевой, лимонной и винной), спиртов и некоторых углеводородов. Испытывались: этиловый спирт, маннит, глицерин и сорбит. Опыты с солями уксусной кислоты дали отрицательные результаты.

Для выяснения пригодности углеводородов употреблялись гексадекан, ксилол, бутилциклогексан и гептан. Образование сернистого железа отмечено только на среде с гексадеканом.

Кроме аммонийных солей, источником азота в процессе восстановления сульфатов могут служить пептон и аспарагин. С альбумином были получены отрицательные результаты. Культуры Ps. Zelinskii n. sp. на синтетических средах дают типичные слизистые колонии грязнорозового цвета при заражении ими МПА. Из этих колоний были снова получены культуры, способные восстанавливать сульфаты путем последовательных посевов в двойную среду, а затем на синтетические среды.

Процесс восстановления сульфатов под влиянием штамма А не мог быть охарактеризован с количественной стороны, так как до настоящего времени удалось вызвать развитие его только в двух последовательных посевах на синтетическую среду II и только в небольшом объеме среды.

Выводы

1. Факультативно аэробные бактерии, выделенные из глубоководных илов Черного моря,— Ps. Zelinskii n. sp.— основная форма и штамм А — обладают способностью развиваться в аэробных условиях в отсутствие сульфатов и восстанавливать сульфаты в анаэробных условиях. Основная форма восстанавливала сульфаты на синтетической среде после длительного культивирования на МП-средах (несколько более трех месяцев). Дальнейшее культивирование в этих условиях приводит к потере способности восстанавливать сульфаты. Штамм А значительно быстрее теряет способность восстанавливать сульфаты при культивировании на МП-средах.

2. Ps. Zelinskii n. sp. образует значительные количества сероводорода на синтетических средах с сульфатами — до 853 мг/л. Отношение количества потребленной молочной кислоты к количеству образовавшегося сероводорода в процессе восстановления сульфатов близко к теоретическому требованию уравнения Baars. Таким образом, по интенсивности и характеру процесса восстановления сульфатов исследованная факультативно-аэробная бактерия сходна с анаэробными возбудителями этого процесса из рода Vibrio.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 12.I.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Пельш А. Д. Динамика десульфатизационного процесса. Тр. Соляной лаборатории, вып. XIV, АН СССР, стр. 5, 1937.
2. Таусон В. О. и Алешина А. И. О восстановлении сульфатов бактериями в присутствии углеводородов. Микробиология, т. 1, вып. 3, стр. 229, 1932.
3. Штурм Л. Д. Морфологические и культуральные признаки факультативно-аэробных бактерий, восстанавливающих сульфаты. Микробиология, т. XVII, вып. 5, 1948.
4. Baars J. K. Over sulfaatreductie door bacterien. Delft, 1930.
5. Fridmann C. and Shaffer P. The determination of lactic acid. J. Biol. Chem., v. 73, p. 335, 1927.
6. Van Delden A. Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduktion durch Bakterien. Ctbl. Bact. Abt. II, Bd. 11, S. 117, 1904.

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ПО БИОХИМИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ПРОТЕИНОБАКТЕРИЙ

В. Н. Шапошников и *Т. А. Таусон*

Биохимическая деятельность микроорганизмов различна и многообразна, а отсюда и пути ее исследования разносторонни и многочисленны. Поэтому в каждом отдельном случае исследователь должен ограничиться тем или иным направлением в зависимости от задач, которые перед ним стоят.

Настоящая работа посвящена изучению некоторых аэробных бактерий, обычно характеризующихся более или менее значительным воздействием на белки и продукты их гидролиза, которые они разрушают с выделением аммиака. По этому последнему признаку их относят к аммонификаторам. Чаще всего аммонифицирующая способность бактерий характеризуется выделением аммиака при культивировании их на мясных или мясопептонных средах.

Многие аммонифицирующие бактерии обладают способностью разрушать желатину, т. е. они должны быть отнесены к устанавливаемой некоторыми авторами группе протеолитических бактерий. Однако следует признать, что как протеолитическая активность, так и аммонифицирующая способность не могут считаться достаточными для установления соответствующих физиологических группировок.

Действительно, протеолитическая активность широко распространена, например, у некоторых молочнокислых бактерий, маслянокислых и, наконец, у некоторых пурпурных бактерий.

Точно так же способность к аммонификации, как показал Буткевич [1, 2], оказывается свойственной в определенных условиях некоторым грибам (Citromyces и др.). Повидимому, она вообще является отражением способности использовать в процессе жизнедеятельности органические кислоты, частными представителями которых и являются продукты протеолиза и гидролиза белков.

Таким образом, вопрос, который мы поставили перед собой в настоящем исследовании, сводится к тому, чтобы установить, существуют ли между аммонификаторами представители, специфично приспособившиеся к жизни за счет белковых веществ и поэтому заслуживающие выделения в группу протеинобактерий, или же они становятся аммонификаторами только при том условии, если в их распоряжении в среде нет безазотистых соединений углерода. На первых этапах мы остановились в этом отношении на изучении влияния углеводов (глюкоза) на жизнедеятельность аммонифицирующих бактерий. Первые же наши опыты на среде с кислотным гидролизатом казеина без глюкозы или с глюкозой показали, что развитие некоторых бактерий в значительной степени стимулируется присутствием сахара в среде. К числу таких бактерий относятся Bact. fluorescens liquefaciens, Bac. subtilis, Bac. mesentericus, Bac. mycoides.

Бактерия Proteus vulgaris, наоборот, во всех случаях давала значительно более пышное развитие на среде с гидролизатом казеина без глюкозы. Присутствие последней тормозило развитие.

Опыты проводились следующим образом: бактерии культивировались при 30° в течение трех и более суток на минеральной среде со-

става: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,005%; KH_2PO_4 — 0,01%; Na_2HPO_4 — 0,04%; $CaCl_2$ — 0,001%; NaCl — 0,001%; $FeSO_4$ — 0,0001%; $MnSO_4$ — 0,0001%; $ZnSO_4$ — 0,0001%; KJ — 0,00001% с кислотным гидролизатом казеина в качестве источника азота и углерода.

Гидролизат прибавлялся из такого расчета, чтобы количество аминного азота в растворе соответствовало количеству азота, находящегося в 0,1—0,5% растворе аминокислоты (приблизительный расчет делался на аланин). Параллельно бактерии культивировались на этой же среде с добавлением глюкозы.

Гидролизат готовился, как обычно, методом, описанным в практических руководствах по биохимии (Кизель, Иванов); гидролиз производился концентрированной HCl, с последующим удалением ее путем выпаривания на водяной бане.

Питательная среда разливалась по 50 мл в колбы Эрленмейера емкостью 250 мл и стерилизовалась в автоклаве при 110° в течение 30 минут. В опытах с сахаром глюкоза добавлялась в питательную среду в виде стерильного раствора в количестве 1%, 3% или 5%.

Посевным материалом служила односуточная культура бактерий на МПА, суспендированная в стерильной водопроводной воде. Количество вносимого посевного материала не превышало 0,1 мг сухого вещества.

В качестве примера можно привести один из опытов, в котором количества образовавшегося сухого вещества бактерий оказались следующими:

Bac. subtilis	среда с сахаром	20,8 мг
	» без сахара	0,8 »
Bac. mesentericus	» с сахаром	12,8 »
	» без сахара	2,4 »
Bac.mycoides	» с сахаром	20,1 »
	» без сахара	8,95 »
Proteus vulgaris	» с сахаром	3,6 »
	» без сахара	6,8 »
Bact. fluorescens liquefaciens	» с сахаром	95,8 »
	» без сахара	58,8 »

Более значительное развитие культур на среде, содержащей, кроме аминокислот, также и сахар, может объясняться только вовлечением последнего в обмен веществ. Сахар при этом может быть использован по двум направлениям: он может служить дополнительным материалом для синтеза вещества тела бактерий или использоваться в качестве энергетического материала. Последними в средах без сахара являются аминокислоты, энергетическое использование которых связано с отщеплением аммиака. Естественно, что при замене в энергетическом использовании аминокислот на безазотистые соединения (глюкозу) аммонификация должна снижаться. Это и было подмечено во всех предварительных опытах. Однако для внесения большей ясности во взаимоотношения различных бактерий с азотистыми и безазотистыми веществами субстрата необходимо было провести количественный учет изменения содержания в среде аминного азота, сахара, выделившегося аммиака и образовавшегося сухого вещества бактериальных тел.

Аминный азот определялся методом формольного титрования по Серенсену, аммиак — отгонкой в вакууме с последующим титрованием. Сахар определялся по методу Бертрана, а количества сухого вещества учитывались путем взвешивания бактериального осадка, собранного на доведенном до постоянного веса мембранном фильтре. Профильтровывалось от 2 до 5 мл образовавшейся бактериальной суспензии. Осадок промывался 10 мл дестиллированной воды и высушивался до постоянного веса.

В этой части работы внимание было уделено двум представителям исследуемой группы бактерий — Bact. fluorescens liquefaciens и Proteus vulgaris. Результаты опытов по влиянию глюкозы на дезаминирование аминокислот гидролизата казеина бактериями представлены в табл. 1.

Таблица 1

Название организма	Возраст культуры в сутках	Условия роста	Дано NH_3 в мг	Израсходовано NH_3		Образовалось NH_3		Образовалось сух. вещества в мг	pH среды	
				в мг	в % от данного	в мг	в % от данного		исходн.	конечн.
Proteus vulgaris	3	с сах.	56,3	13,15	23,3	12,08	21,4	17,0	7,3	6,4
		без сах.	56,3	25,92	40,0	22,78	40,4	32,0	7,3	7,7
	3	с сах.	2,61	1,28	49,0	1,04	39,0	1,85	7,1	6,0
		без сах.	2,31	1,92	83,0	1,40	53,6	4,0	7,1	8,0
Bact. fluorescens liquefaciens	3	с сах.	29,68	25,7	86,5	2,04	6,8	111,8	7,7	7,2
		без сах.	29,68	12,38	41,7	8,33	28,0	67,9	7,7	8,5
	3	с сах.	29,68	25,76	86,7	1,87	6,3	95,8	7,1	6,8
		без сах.	29,68	15,08	50,8	10,63	35,8	58,8	7,1	8,4

Приведенные в таблице цифры показывают, что и Proteus vulgaris и Bact. fluorescens liquefaciens независимо от концентрации гидролизата в среде и от pH среды (в пределах 7,7—7,1) во всех случаях образуют аммиака больше в среде без глюкозы.

Однако было бы преждевременным заключить, что глюкоза подавляет дезаминирующую активность той или иной бактерии, так как по количеству выделившегося аммиака еще нельзя судить об интенсивности дезаминирующей способности организма, потому что в виде аммиака выделяется не вошедший в синтезы азот и, следовательно, количество избыточного аммиака зависит не только от интенсивности дезаминирования, но и от интенсивности ассимиляции азота. И действительно мы видим, что в то время как аммиака выделяется и Bact. fluorescens liquefaciens и Proteus vulgaris значительно больше в культуре, растущей без сахара, количество исчезнувшего из питательной среды аминного азота у Proteus vulgaris больше при отсутствии глюкозы, у Bact. fluorescens liquefaciens, наоборот,— больше в присутствии глюкозы.

Очевидно, глюкоза, являясь для Bact. fluorescens liquefaciens не только энергетическим, но и пластическим материалом, требует значительно большего количества азота; этим, возможно, и обусловлена бо́льшая активность Bact. fluorescens liquefaciens в отношении потребления аминокислот.

Proteus vulgaris, накапливая значительно меньшие количества сухого вещества в присутствии глюкозы, повидимому, при синтезе клеточных

веществ ограничивается использованием в качестве источника углерода только углеродных группировок аминокислот, и не исключена возможность, что глюкоза не используется им в конструктивном обмене.

Для проверки правильности последнего вывода был поставлен ряд опытов с количественным учетом потребленной глюкозы, образовавшегося аммиака и сухого вещества бактерий, причем в питательную среду вводились разные количества глюкозы. Результаты двух таких опытов представлены на рис. 1 и 2.

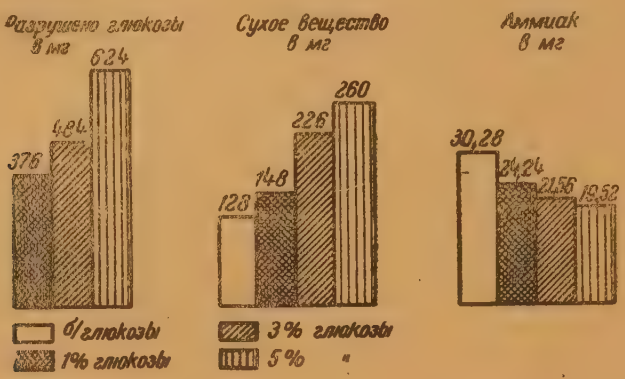


Рис. 1. Bact. fluorescens liquefaciens, 5-суточная культура (40 см³ среды). Исходное значение pH = 7,7

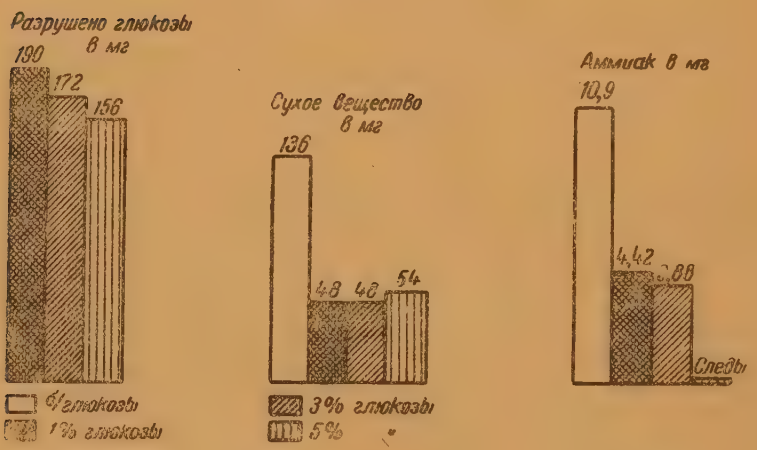


Рис. 2. Proteus vulgaris, 5-суточная культура (40 см³ среды). Исходное значение pH = 7,7

Сопоставляя данные рисунков, мы видим, что в культуре Bact. fluorescens liquefaciens по мере возрастания концентрации глюкозы в среде возрастают и количества потребленного сахара. При наличии в среде 1% глюкозы 5-суточная культура Bact. fluorescens liquefaciens потребила 376 мг ее, при наличии 3%—434 мг и при наличии 5%—624 мг. Соответственно и сухого вещества бактерий образовалось 148 мг, 226 мг и 260 мг, в то время как в среде без глюкозы сухого вещества накопилось всего 128 мг. Количество аммиака в тех же условиях соответственно становилось все меньше, что стоит в полном соответствии

со сделанными нами предположениями об использовании глюкозы Bact. fluorescens liquefaciens не только в качестве энергетического, но и в качестве пластического материала.

Если пересчитать количество выделившегося аммиака на 1 мг сухого вещества, то мы получим следующий итог: при построении 1 мг сухого вещества в отсутствие глюкозы ненужным оказывается 0,23 мг аммиачного азота. При наличии 1% глюкозы в среде излишек азота снизился до 0,16 мг; при наличии 3% глюкозы в среде ненужного азота оказалось 0,09 мг, а при 5% глюкозы выбрасывается в виде аммиака только 0,07 мг азота.

Если подобный пересчет произвести в результатах, характеризующих жизнедеятельность Proteus vulgaris, то мы увидим, что количество аммиака, выделившегося при синтезе 1 мг сухого вещества, и в среде без глюкозы и в среде с 1% глюкозы выражается одной и той же величиной — 0,08 мг. Количество аммиака, образующееся в присутствии глюкозы, как обычно, значительно меньше того количества, которое образуется в среде без глюкозы, вследствие того что глюкоза тормозит развитие Proteus vulgaris. Присутствие в среде разных концентраций глюкозы почти не сказывается ни на образовании аммиака, ни на образовании сухого вещества: так, при наличии в питательной среде 1% глюкозы аммиака образовалось 4,42 мг, а при 3%—3,88 мг. Сухого вещества бактерий в присутствии 1%, как и в присутствии 3% глюкозы, образовалось 48 мг, в то время как на среде без глюкозы сухое вещество бактерий весило 136 мг.

Полученные данные с достаточной убедительностью доказывают, что Proteus vulgaris в условиях наших опытов не использует глюкозу в качестве пластического материала, полностью покрывая потребности в азоте и углероде за счет аминокислот. Глюкоза же используется им только как энергетический материал.

Подводя итоги изложенному, мы должны сказать, что Bact. fluorescens liquefaciens и Proteus vulgaris, образующие в культуре аммиак и разрушающие глюкозу с образованием кислот (о чем говорит сдвиг реакции среды в кислую сторону), принадлежат к различным физиологическим группам, так как они различаются по характеру использования и аминокислот и глюкозы.

Дальнейшие, более подробные исследования условий роста и определение промежуточных продуктов обмена того и другого организма позволят подойти к выяснению возможных механизмов разрушения и ассимиляции веществ питательной среды и к выяснению причин, лежащих в основе резкого отличия Proteus vulgaris от других видов протеинобактерий.

Выводы

1. Присутствие глюкозы в минеральной питательной среде с кислотным гидролизатом казеина (pH = 7,1—7,7) стимулирует дезаминирующую способность Bact. fluorescens liquefaciens и тормозит активность Proteus vulgaris. Количество аммиака, накапливающегося при этом в культуре, глюкоза снижает как в том, так и в другом случае.

2. Полученные результаты позволяют заключить, что Proteus vulgaris и Bact. fluorescens liquefaciens, являясь активными разрушителями белков, отличаются друг от друга характером использования аминокислот и глюкозы.

В то время как для Proteus vulgaris аминокислоты являются источником и азота и углерода, а глюкоза используется им, повидимому, только как источник энергии, для Bact. fluorescens liquefaciens амино-

кислоты в основном служат только источником азота, глюкоза же является для нее не только энергетическим, но и пластическим материалом.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 18.V.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич В. Л. Über die Bildung der Oxalsäure und des Ammoniaks in den Kulturen von Aspergillus niger auf Pepton. Biochem. Z., Bd. 129, S. 445, 1922.
2. Буткевич В. Л. Die Ausnutzung des Peptons als Kohlenstoffquelle durch die Citromycesarten. Biochem. Z., Bd. 129, S. 455, 1922.

ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АЗОТОБАКТЕРОМ В ПРИСУТСТВИИ АМИДО- И АМИНОКИСЛОТ

М. В. Федоров

Отношение азотобактера к различным источникам связанного азота представляет существенный научный интерес с двух точек зрения: во-первых, на основе этих данных можно точнее определить, какие соединения азота в почве будут мешать азотфиксирующей активности азотобактера, и, во-вторых, на их основе можно легче ориентироваться в физиологических особенностях данного бактериального организма. Несмотря на первостепенное значение этих данных для понимания азотистого обмена у азотобактера и механизма фиксации им азота атмосферы, литературные сведения по этому вопросу крайне ограничены (Костычев [5]; Виноградский [2, 14]; Blom [11]; Burris и Wilson [12]; Федоров [9] и другие) и связаны главным образом с испытанием минеральных азотистых веществ. Органические источники азота почти не изучались, и их влияние на фиксацию атмосферного азота остается мало известным, хотя для установления азотфиксирующей активности азотобактера в почве, особенно занятой посевом многолетних трав, восстанавливающих ее плодородие, эти данные очень важны.

Все нижеописываемые опыты ставились на минеральной питательной среде для азотобактера (наша модификация), содержащей 1,8 г инвертного сахара на 100 мл среды (pH около 7,0). Среда разливалась в колбы Эрленмейера объемом в 300 мл по 100 мл и стерилизовалась в автоклаве при 0,5—0,75 атмосферы полчаса. После стерилизации среда заражалась 1—2 мл суспензии чистой культуры Azotobacter agile (чистота культуры каждый раз тщательно проверялась до и после опыта). Опыты велись при 30° от 15 дней до 30 дней. По окончании опыта в среде производились определения общего азота (по Кьельдалю), азота в растворе и в клетках азотобактера (по Кьельдалю, после центрифугирования при 4 000 оборотов в минуту), числа клеток азотобактера (методом прямого счета под микроскопом) и неиспользованного сахара (по Бертрану).

В первой серии опытов изучалось влияние на фиксацию молекулярного азота амидов. Вначале было испытано влияние формамида ($HCO \cdot NH_2$) и ацетамида ($CH_3CO \cdot NH_2$), добавлявшихся к питательной среде до концентрации 0,05 моля (на 100 мл среды вводилось до 70 мг амидного азота). С обоими амидами были получены совершенно однотипные результаты: азотобактер хорошо развивался и, несмотря на наличие в среде 70 мг амидного азота, продолжал фиксировать азот из атмосферы и даже еще более продуктивно, чем без этих соединений в среде. Так, например, азотфиксирующая активность на среде с 0,01 моля ацетамида в среде была на 30,7% выше контроля, а с 0,05 моля — на 2,2% выше контроля.

На этом основании нами было высказано положение, что амидный азот недоступен азотобактеру и амиды не могут образоваться в качестве первичных продуктов фиксации азота атмосферы (Федоров [9]). Так как некоторые соединения азота, содержащие в своем составе и аминную и амидную группу (аспарагин и глутамин), играют важнейшую роль в жизни растительных организмов, то изучение отношения азото-

бактера к этим соединениям азота представляло значительный интерес, тем более что оно могло дать основу и для общей оценки значения этих соединений в азотистом обмене азотобактера. Первый опыт был поставлен с аспарагином. Результаты его приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Фиксация молекулярного азота азотобактером при наличии в среде аспарагина ($CO \cdot NH_2 \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot COOH$)

Концентрация в среде аспарагиновой к-ты в молях	Содержалось азота в аспарагиновой к-те в мг	Использовано сахара в г	Использовано сахара в % от контроля	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
				на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	0,0	1,65 1,70	100,0	13,45 13,42	13,44	2419,2	100,0
0,001	2,8	1,65 1,70	100,0	16,64 15,94	16,29	2932,2	121,2
0,005	14,0	1,65 1,75	101,5	15,19 11,48	13,38	2408,4	99,5
0,010	28,0	1,65 1,75	101,5	9,49 9,84	9,67	1740,6	71,9
0,020	56,0	1,65 1,75	101,5	8,10 8,25	8,18	1472,4	60,9

Как показывают эти цифры, отношение азотобактера к аспарагину весьма своеобразно. Малые дозы этого вещества в среде (2,8 мг азота) оказывают явно стимулирующее влияние на азотфиксацию. В варианте с 0,001 моля аспарагина в среде азотфиксация оказалась на 21,2% выше, чем в контроле. Повидимому, малые дозы этого вещества создают более благоприятную обстановку для выполнения этого процесса, хотя сразу и трудно определить, в чем именно заключается это благоприятное влияние. Весьма возможно, что одна из аминных групп этого соединения участвует в процессах переаминирования, которые, по данным Lichtstein и Cohen [13], в культурах азотобактера (Azotobacter Vinelandii) осуществляются с необычайно высокой интенсивностью и связаны с новообразованием белка и с процессами роста. Так как в наших предыдущих работах [7] было показано, что между ростом числа клеток азотобактера и фиксацией им азота атмосферы имеется прямая зависимость, то активизирующее влияние малых доз аспарагина на фиксацию молекулярного азота становится понятным и не требует иных предположений, кроме только что высказанного.

В другом опыте, на описании которого мы останавливаться не будем, были получены еще более интересные результаты аналогичного типа.

Однако более высокие дозы аспарагина все же начинают постепенно тормозить азотфиксацию, повидимому, доставляя организму небольшие количества связанного азота. Так как амидная группа азотобактером не усваивается, то в данном случае, возможно, начинает оказывать влияние аминная группа. Однако и эта группа усваивается весьма медленно и в очень малом масштабе. В варианте с 0,02 моля аспарагина в среде, содержавшей 56 мг связанного азота на 100 мл питательной жидкости, азотобактер все же продолжал усваивать атмосферный азот в пределах 8,18 мг на каждый грамм использованного сахара. Поэтому

не исключена возможность, что и аминогруппа аспарагина недоступна азотобактеру и небольшое понижение в интенсивности азотфиксации определяется не усвоением им связанного азота, а иными причинами, связанными с механизмом фиксации.

В связи с таким отношением азотобактера к азоту аспарагина возникла необходимость провести опыты с аспарагиновой кислотой, содержащей только одну аминную группу. Эти опыты ставились на той же питательной среде и при тех же условиях, что и ранее, и дали результаты, приведенные в табл. 2.

Таблица 2

Влияние на фиксацию молекулярного азота азотобактером аспарагиновой кислоты ($COOH \cdot CH \cdot NH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$)

Концентрация в среде аспарагиновой к-ты в молях	Содержалось азота в аспарагиновой к-те в мг	Использовано сахара в г	Использовано сахара в % от контроля	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
				на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	0,0	1,80 1,80	100,0	13,60 13,41	18,50	2 430,0	100,0
0,001	1,4	1,80 1,80	100,0	13,71 13,50	13,60	2 448,0	100,7
0,005	7,0	1,80 1,80	100,0	12,00 10,82	11,41	2 053,8	84,5
0,010	14,0	1,60 1,45	84,7	9,13 10,25	9,69	1 564,4	71,7
0,030	42,0	1,35 1,35	75,0	8,40 9,40	8,90	1 602,0	66,1

Малые дозы аспарагиновой кислоты также стимулируют азотфиксацию, а высокие дозы несколько тормозят ее. Однако и здесь твердой количественной зависимости не наблюдается. В самом деле, если бы азот аспарагиновой кислоты был доступен азотобактеру, то в варианте с 0,03 моля этого вещества в среде, содержащей 42 мг аминного азота в растворе, все потребности этого организма в этом элементе были бы покрыты полностью и никакой фиксации азота из атмосферы не должно бы наблюдаться. Однако анализы показывают, что даже при этих условиях идет еще усиленная фиксация молекулярного азота, отвечающая 8,9 мг на 1 г использованного сахара. Очевидно, и азот аминогруппы аспарагиновой кислоты мало доступен азотобактеру, если он доступен вообще. Малая доступность этой формы связанного азота может определяться двумя причинами: 1) слишком медленной диффузией этого вещества в протоплазму клетки или же 2) отсутствием ферментов, вызывающих дезаминирование этого соединения.

Если принять для объяснения этих явлений вторую точку зрения, то данные Блинкова [1] о резко выраженной способности азотобактера в жизнедеятельном состоянии вызывать дезаминирование глутаминовой кислоты теряют свое значение и могут быть объяснены только недостаточной чистотой культуры. Такое заключение следует не только из данных этого опыта, но и из данных двух, далее описываемых опытов. Один из них был поставлен с испытанием влияния на азотфиксацию глутаминовой кислоты, а другой представлял собой попытку выращивания азотобактера на разных аминокислотах как единственных источниках органического вещества. Результаты первого опыта приводятся в табл. 3.

Таблица 3

Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером глутаминовой кислоты ($COOH \cdot CH \cdot NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2COOH$)

Концентрация глутаминозой к-ты в среде в молях	Содержалось азота в глутаминовой к-те в мг	Использовано сахара в г	Использовано сахара в % от контроля	Фиксировано азота атмосферы в мг: на 1 г сахара в отдельной культуре	Фиксировано азота атмосферы в мг: на 1 г сахара в среднем	Фиксировано азота атмосферы в мг: на 1 г-моль гексоз	Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
Контроль	0,0	1,80 1,80	100,0	13,60 13,41	13,50	2 430,0	100,0
0,001	1,4	1,80 1,80	100,0	13,15 12,45	12,80	2 304,0	94,8
0,005	7,0	1,80 1,80	100,0	11,28 11,22	10,25	2 025,0	84,8
0,010	14,0	1,80 1,80	100,0	10,90 8,40	9,65	1 737,0	71,4
0,030	42,0	1,80 1,80	100,0	9,76 10,08	9,92	1 785,6	73,5

Эти данные полностью подтверждают ранее высказанное предположение, что аминный азот или используется в очень малых дозах, или не используется совсем. Ни в одном варианте опыта не удалось констатировать полного отсутствия азотфиксации. Только в варианте с 0,03 моля этого вещества в растворе, содержавшем 42 мг связанного азота, фиксация отвечала 9,92 мг на 1 г сахара, т. е. была несколько ниже, чем в контроле. Поэтому причина угнетающего действия глутаминовой кислоты более сложная, чем замена молекулярного азота связанным азотом, и требует дальнейших, более детальных исследований.

Помимо добавления к питательной среде с сахаром отдельных аминокислот, были сделаны попытки выращивания азотобактера на отдельных аминокислотах как единственном источнике углерода. Для этой цели были использованы гликоколь, аланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и лейцин. Кроме них, испытывались еще аспарагин и ацетамид. Если бы азотобактер обладал дезамидирующими и дезаминирующими ферментами, то на ряде аминокислот он мог бы развиваться, так как в результате гидролитического дезаминирования из них получились бы оксикислоты, легко используемые азотобактером в качестве источников углерода (гликолевая, молочная, яблочная, оксиглутаровая и другие). Правда, при этом должно бы наблюдаться накопление аммиака в пределах 10—15 мг (все аминокислоты использовались в концентрации 0,025 моля). Однако ни в одном случае, несмотря на 5-месячный срок культуры и дважды произведенный засев 2 мл суспензии азотобактера (pH среды около 7,0), никакого развития этого организма констатировать не удалось и, конечно, никакого накопления аммиака не было обнаружено. Из этого следует, что данные Блинкова о дезаминирующем действии азотобактера и с этой стороны не находят подтверждения.

Ограниченное использование отдельных аминокислот для синтетической деятельности азотобактера неизбежно следует и из данных следующего опыта, в котором к обычной питательной среде для азотобактера с 1,8 г инвертного сахара на 100 мл среды добавлялись различные аминокислоты в концентрации 0,01 моля. Опыт продолжался 15 дней при температуре 30°. Повторность всюду была трехкратной. В конце опыта в двух колбах производилось определение общего азота по Кьельдалю, а в третьей колбе азот определялся фракционно: отдельно в составе клеток азотобактера и отдельно в растворе. Результаты анализа приводятся в табл. 4.

Таблица 4

Фиксация молекулярного азота азотобактером в присутствии различных амино- и амидокислот

Варианты опыта	Содержалось азота в растворе до опыта в мг	Осталось азота в растворе после опыта в мг	Использовано сахара в г	Использовано сахара в % от контроля	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
					на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	0,0	3,36	1,65 1,55 1,50	100,0	3,83 13,35 11,57	12,92	2 325,6	100,0
0,01 моля гликоколя	14,0	13,51	1,50 1,45 1,55	95,8	9,24 10,27 11,24	10,25	1 845,0	79,8
0,01 моля аланина	14,0	12,32	1.40 1,30 1,30	85,1	10,50 10,72 9,64	10,29	1 852,2	79,9
0,01 моля аспарагиновой к-ты	14,01	13,54	1,60 1,50 1,50	97,9	11,46 12,41 12,73	12,20	2 196,9	94,4
0,01 моля глутаминовой к-ты	14,0	12,20	1,60 1,60 1,60	102,1	12,72 11,81 12,83	12,39	2 230,0	95,9
0,01 моля тирозина	14,0	9,70	1,70 1,60 1,45	101,1	9,72 9,98 10,11	9,94	1 789,2	76,9
0,01 моля лейцина	14,0	12,18	1,40 1,60 1,40	93,6	11,76 10,41 11,12	11,09	1 996,2	85,9
0,01 моля ацетамида	14,0	16,66	1,65 1,70 1,55	104,3	15,02 16,31 16,70	16,01	2 881,8	123,9
ч,005 моля мочевины	14,0	10,82	1,40 1,40 1,40	89,4	10,10 9,05 10,63	9,93	1 784,4	76,9
0,01 моля хлористого аммония	14,0	7,23	1,50 1,40 1,40	91,5	7,09 7,00 7,16	7,08	1 274,4	54,8

Как можно видеть из этих цифр, только один ацетамид остался в растворе полностью сохранившимся. Повидимому, он очень слабо диффундирует в клетку и не может участвовать в построении азотистых веществ протоплазмы. Но так как это соединение относится к слабым наркотикам, то в применявшихся дозах оно повышает как окисление сахара в дыхании, так и фиксацию азота атмосферы (на 23,9% по сравнению с контролем). В отношении же всех аминокислот была выявлена одна и та же закономерность: они оказались или совсем недоступными азотобактеру или же использовались им в очень малой степени. Об этом можно судить по тому, что содержание общего азота в растворе только на 1—2 мг было меньше, чем вносилось с соответствующей аминокислотой. Если даже учесть, что в контрольном варианте опыта 3 мг азота диффундировали из клеток в среду, то и в этом случае усвоение аминного азота не превосходит 2—4 мг. Этот факт бесспорно показывает, что при наличии в среде аминного азота азотобактер предпочитает пользоваться азотом атмосферы. Но наличие этой формы азота в среде все же оказывает заметное влияние на характер синтетических процессов в клетке и, видимо, на количественный состав синтезируемых азотистых веществ. Об этом можно судить по реакции

Фельгена на тимонуклеиновую кислоту. Эта реакция давала неодинаково интенсивную окраску бактериальных клеток, выращенных на среде с аминокислотами и без них. Она осуществлялась после центрифугирования и промывания клеток согласно с техническими указаниями Имшенецкого [3]. Фиксация производилась спиртом (24 часа), а гидролиз — 0,1 *N* соляной кислотой (при 60° 10 минут). После добавления фуксинсернистой кислоты в отдельных вариантах опыта, в частности в вариантах с аспарагиновой кислотой, аспарагином, гликоколем, аланином и глутаминовой кислотой, появилось явное фиолетовое окрашивание уже через 5 минут; оно получало полное развитие через 30 минут. Клетки же азотобактера, выращенные на среде без связанных соединений азота, давали очень слабое фиолетовое окрашивание, постепенно развивавшееся в течение нескольких часов. Эти данные представляются интересными с двух точек зрения: во-первых, они показывают нам, что даже при очень малом потреблении аминного азота из среды все же азотистый метаболизм клеток азотобактера заметно меняется и структурные азотистые соединения синтезируются в бо́льших количествах. Так как наиболее интенсивное окрашивание получилось при использовании аспарагиновой и глутаминовой кислот, то предположение об их участии в процессах синтеза, в частности в процессах переаминирования, становится вполне реальным. Во-вторых, эти данные дополняют выводы Имшенецкого [4], что азотобактер крайне беден нуклеиновой кислотой и поэтому должен занимать промежуточное положение между бактериями и синезелеными водорослями. Он беден нуклеиновой кислотой только при росте на среде без связанного азота.

Далее, для установления, как идет использование аминного азота во времени, был поставлен еще один опыт, в котором культура азотобактера заканчивалась через определенные промежутки времени. Опыт ставился с добавлением в среду 0,01 моля или аспарагиновой или глутаминовой кислоты (в каждых 100 мл среды содержалось 14 мг аминного азота). Первая пара колб была снята через 10 дней, а затем по 2 колбочки снимались через каждые 4 дня. Во всех случаях клетки отделялись центрифугированием, а общий азот определялся отдельно в растворе и в осадке отцентрифугированных клеток.

Результаты этих анализов приведены в табл. 5.

Данные этого опыта показывают, что в первые периоды культуры, вместо потребления азотистых веществ из раствора, наблюдается заметная диффузия каких-то продуктов фиксации из клетки в окружающую среду. До 18-дневного периода культуры, т. е. до момента, когда сахар находится уже на грани полного использования, количество общего азота в среде все время выше, чем было внесено с аминокислотой. На этом основании можно предполагать, что в ходе азотфиксации образуется некоторый избыток азотистых веществ, побочно возникающий в ходе этого процесса и не используемый при синтезе белковых веществ протоплазмы. Правда, этот избыток не так велик и в подавляющем большинстве случаев не превышает 1—2 мг азота, но тем не менее он вполне реален и для понимания хода процесса имеет важное значение. Только после исчерпания источника углерода начинает наблюдаться постепенная убыль азота из культуры в целом и из питательного раствора в частности.

Для более всестороннего освещения всех этих явлений, конечно, необходимы были бы количественные определения не только общего азота, но и отдельных форм его. Однако в ходе описанного опыта нам не удалось эти анализы осуществить. Только в настоящее время такие анализы проводятся, и они в дальнейшем восполнят этот пробел и позволят значительно полнее охарактеризовать отношение азотобактера к аминному азоту.

Таблица 5

Фиксация молекулярного азота азотобактером в разные стадии культуры в присутствии аспарагиновой и глутаминовой кислот

Продолжительность опыта (в днях)	Использовано сахара в г	Использовано сахара в % от концентрации	Осталось азота в растворе в мг	Азот в растворе в среднем в мг	Фиксировано азота атмосферы в мг		
					на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз
Аспарагиновая кислота							
10	1,45 1,50	81,9	15,5 14,9	15,20	11,93 12,73	12,33	2 219,4
14	1,50 1,40	80,6	14,0 14,50	14,25	12,80 13,03	12,93	2 327,4
18	1,60 1,65	90,3	15,52 15,18	15,35	13,41 12,86	13,14	2 365,2
22	1,65 1,70	93,1	15,85 13,16	14,51	12,38 12,40	12,39	2 230,2
26	1,80 1,80	100,0	12,37 13,11	12,74	9,44 11,07	10,25	1 845,0
Глутаминовая кислота							
10	1,35 1,50	79,2	15,90 15,85	15,87	13,86 14,40	14,18	3 642,4
14	1,50 1,50	83,3	17,00 17,00	17,00	12,70 13,85	13,28	2 390,4
18	1,60 1,60	88,8	14,85 16,90	15,87	13,08 12,61	12,84	2 311,2
22	1,70 1,70	94,4	14,46 16,00	15,23	12,30 13,47	12,89	2 320,2
26	1,80 1,80	100,0	12,80 13,50	12,84	12,07 10,83	11,45	2 061,0

После того как было установлено, что аминный азот мало доступен азотобактеру, можно было заранее предположить, что гиппуровая кислота не будет оказывать угнетающего действия на фиксацию азота атмосферы. Однако для большей уверенности были поставлены дополнительные опыты с использованием указанного вещества. При испытании гиппуровой кислоты, кроме того, представляло интерес установить, может ли азотобактер разрывать связь между гликоколем и бензойной кислотой. Опыты ставились на той же питательной среде с инвертным сахаром, что и ранее. Результаты их приводятся в табл. 6.

Приведенный цифровой материал убедительно показывает, что азот гиппуровой кислоты совершенно недоступен азотобактеру. В варианте с 0,02 моля этого вещества в среде количество связанного азота отвечало 28 мг на 100 мл раствора и могло бы полностью обеспечить азотобактер азотистой пищей. И, несмотря на это, он продолжал питаться азотом атмосферы, даже с еще большей продуктивностью, чем на среде, не содержавшей этого соединения в растворе. Азот гиппуровой кислоты как бы не существует для азотобактера и не может вовлекаться им в цикл превращений азотистых веществ внутри протоплазмы клетки. Существо дела, повидимому, связано с аминной группировкой, так как в варианте с 0,02 моля гиппуровой кислоты, но без сахара, было констатировано, правда для одной колбы, крайне любопытное явление. Азотобактер развился и фиксировал из атмосферы 3,1 мг молекулярного азота. Это своеобразное явление можно объяс-

Таблица 6

Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером гиппуровой кислоты ($C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$)

Концентрация гиппуровой к-ты в среде в молях	Содержалось азота в мг	Использовано сахара в г	Использовано сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
				на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	0,00	1,80 1,80	100,0	11,53 12,01	11,74	2 118,6	100,0
0,001	1,40	1,80 1,80	100,0	11,66 11,90	11,78	2 120,4	100,1
0,005	7,00	1,80 1,80	100,0	11,82 12,62	12,22	2 299,6	103,8
0,010	14,00	1,80 1,80	100,0	11,52 11,52	11,52	2 073,6	97,9
0,020	28,00	1,80 1,80	100,0	15,79 11,52	13,65	2 457,0	116,8
0,020 (без сахара)	28,00	0,00 0,00	0,0	0,83 3,10	—	—	—

нить только тем, что азотобактер, видимо, произвел гидролиз гиппуровой кислоты на бензойную и аминоуксусную кислоты

$$C_6H_5.CO.NH.CH_2.COOH + H_2O = C_6H_5.COOH + CH_2NH_2COOH.$$

Бензойная кислота была далее использована им в качестве энергетического материала для фиксации атмосферного азота, а аминоуксусная кислота, аналогично другим аминокислотам, осталась в растворе без изменения. Эти данные еще раз подчеркивают, какую своеобразную физиологию имеет азотобактер и как специфично он относится к связанным соединениям азота. Поэтому дальнейшее развитие исследований в этом направлении представляет бесспорный научный интерес.

Опыты с мочевой кислотой ставились на той же среде с инвертным сахаром и продолжались при 30° 21 день. Результаты их приведены в табл. 7. Они представляют интерес в связи с тем, что в этой кислоте содержится группировка азота, близкая к органическим основаниям, входящим в состав нуклеиновой кислоты.

Азот мочевой кислоты также недоступен азотобактеру. В варианте с 0,10 моля этого вещества в среде, содержавшей 560 мг связанного азота, фиксация атмосферного азота была даже на 13,1% выше, чем в контроле (в среде было найдено 579,6 мг общего азота). Совершенно очевидно, что эти формы связанного азота азотобактер не может использовать.

Так как в тимонуклеиновой кислоте содержатся близкого типа группировки азота, то следовало думать, что они также не будут усваиваться азотобактером. Опыт показал, что это предположение в полной мере отвечает действительности.

Приведенные данные ясно показывают, что очень многие формы связанного азота совершенно недоступны азотобактеру. При наличии даже огромных доз этих соединений в среде он предпочитает пользоваться азотом атмосферы. К числу практически недоступных источников азота приходится отнести и многие аминокислоты, крайне легко используемые большинством бактерий. Становится очевидным положение, что у азотобактера совершенно своеобразная физиология и совершенно своеобразный обмен азотистых веществ. Поэтому дальнейшее

Таблица 7

Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером мочевой кислоты

Концентрация мочевой к-ты в среде в молях	Содержалось азота в мочевой к-те в мг	Использовано сахара в отдельной культуре в г	Использовано сахара в % от контроля	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в % от контроля
				на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	0,00	1,70 1,75	100,0	11,20 10,72	10,96	1 972,8	100,0
0,001	5,60	1,75 1,75	101,4	11,32 11,01	11,16	2 008,8	101,9
0,005	28,00	1,60 1,60	92,8	9,49 9,97	9,73	1 751,4	89,9
0,010	56,00	1,55 1,60	91,3	8,96 8,96	8,96	1 612,8	81,7
0,050	280,00	1,65 1,60	94,2	12,60 9,63	11,12	2 001,6	101,5
0,100	560,00	1,50 1,65	91,3	12,80 12,00	12,40	2 232,0	113,1

накопление фактического материала, характеризующего азотистый обмен азотобактера, позволит нам скорее подойти не только к разгадке химического механизма фиксации им азота атмосферы, но и точно определить, при каких условиях в почве азотфиксирующая деятельность будет протекать нормально и при каких условиях она будет в той или иной мере подавляться.

Выводы

1. Минеральные формы связанного азота (аммиачные соли, азотистокислые и азотнокислые соли) могут усваиваться азотобактером, поэтому их наличие в почвенном растворе будет понижать азотфиксирующую активность этого организма.

2. Азот амидов совершенно не усваивается азотобактером, поэтому следует считать исключенной и возможность образования амидов в качестве первичных продуктов фиксации молекулярного азота азотобактером.

3. Аминный азот различных аминокислот также очень мало доступен азотобактеру. При введении в среду более 40—50 мг аминного азота аспарагиновой или же глутаминовой кислоты фиксация молекулярного азота только в незначительной степени снижается. В силу ли медленной диффузии аминокислот в клетку или же в силу отсутствия дезаминаз аминный азот не может заменять азотобактеру молекулярный азот.

4. Малые дозы аспарагиновой и глутаминовой кислот не только повышают интенсивность фиксации азота атмосферы, но, повидимому, усиливают вообще синтез азотистых соединений, участвующих в образовании структуры клетки. Свидетельством этого может служить более усиленное накопление в клетке ядерных веществ, в частности тимонуклеиновой кислоты. Из этих данных следует заключить, что указанные аминокислоты в малых дозах используются в клетке в процессах переаминирования.

5. Азотобактер обладает совершенно своеобразной физиологией и совершенно своеобразным азотистым обменом, поэтому дальнейшее накопление фактического материала, характеризующего этот обмен, по-

зволит не только ближе подойти к разгадке химического механизма азотфиксации, но и точно установить, при каких условиях азотфиксирующая деятельность этого организма в почве может достигнуть максимального развития.

Московская сельскохозяйственная
Академия имени К. А. Тимирязева

Получено 28.IV.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинков Г. О выделении аммиака азотобактером. Микробиология, т. XVI, вып. 2, стр. 113, 1947.
2. Виноградский С. Метод почвенной микробиологии, примененной при изучении азотобактера и нитрифицирующих бактерий. Успехи биологии, химии, вып. XIII, стр. 18, 1937.
3. Имшенецкий А. Строение бактерий. Монография. Москва, 1940.
4. Имшенецкий А. О филогении Az. chroococcum. Микробиология, т. XV, вып. 6, 1946.
5. Костычев С., Рыскальчук А. и Швецова О. Химические исследования над связыванием молекулярного азота микробом Az. agile. Тр. Гос. Ин-т опытн. агрон., т. 1, стр. 91, 1926.
6. Костычев С. и Шелоумова А. Связывание атмосферного азота и образование аммиака. Изв. АН СССР. Сер. биолог., т. 1, стр. 662, 1934.
7. Федоров М. Химизм фиксации азота атмосферы азотобактером. Микробиология, т. XV, вып. 3, 1946.
8. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером веществ, реагирующих с аминной группой катализатора. ДАН СССР, т. XLIX, вып. 9, 1945.
9. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы различных соединений азота. ДАН СССР, т. LII, вып. 1, 1946.
10. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы веществ, реагирующих с катализатором азотфиксации, как с основанием. ДАН СССР, т. LV, стр. 855, 1947.
11. Blom J. Hydroxylamin (NH_2OH) als Zwischenprodukt bei der Fixierung atmosphärischen Stickstoffes. Biochem, Z., Bd. 134, S. 385, 1928.
12. Burris and Wilson. The metabolism of ammoniak by Az. Vinelandii. J. Bact., v. 47, p. 410, 1944.
13. Lichtstein H. and Cohen P. J. Biol. Chem., v. 157, p. 85, 1945, Цит. по Кониковой. Аминокислотный обмен бактерий. Успехи современной биохимии. Сб. тр. объед. научн. конф. ин-тов биол. и мед. химии, т. 1, стр. 99, 1947.
14. Winogradsky S. Sur la synthèse de l'ammoniaque par les azotobacter du sol. C. R. Paris, v. 190, p. 661, 1930.

ДЕГИДРИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ ОСЛАБЛЕННЫМИ ФОРМАМИ CL. WELCHII HOLLAND

Г. М. Френкель, В. В. Липшиц и М. К. Карпенко

Изучая развитие на питательных средах клеток факультативных анаэробов Staphylococcus pyogenes и Streptococcus lactis, поврежденных прогревом, Френкель установила, что для их роста необходимым условием является частичный анаэробиоз. Такой анаэробиоз в опытах Френкель осуществлялся при помощи снижения парциального давления кислорода, применения полужидких сред и т. п.

Френкель назвала варианты микробов, вырастающие в вышеупомянутых условиях на питательных средах из клеток, поврежденных прогревом или другими вредными воздействиями,— ослабленными формами. Френкель показала [2], что рост этих ослабленных форм начинается при более низком окислительно-восстановительном потенциале среды, чем рост неповрежденных клеток.

Однако кривые, характеризующие динамику изменения окислительно-восстановительного потенциала среды в процессе роста ослабленных форм Streptococcus lactis, существенно не отличаются от кривых роста нормальных форм этого микроба [3].

Липшиц [1] (в той же лаборатории) показала, что для роста поврежденных прогревом при сублетальной температуре клеток Cl. Welchii необходимо соблюдать более строгие условия анаэробиоза, чем для роста неповрежденных клеток этого микроба. Поврежденные прогревом клетки Cl. Welchii не растут на МПБ, из которого воздух удален кипячением. Не растут они на этом же бульоне с различными углеводами. На тех средах, на которых они растут (среда Китт — Тароцци, полужидкие среды, среды с добавлением различных редуцирующих веществ), рост начинается при более низком окислительно-восстановительном потенциале, чем рост неповрежденных клеток этого микроба.

Таким образом, этими работами было показано значение анаэробиоза для развития ослабленных форм факультативного (Streptococcus lactis) и облигатного (Cl. Welchii) анаэробов.

Исходя из этих наблюдений, мы сделали предположение, что большая потребность в анаэробиозе у ослабленных прогревом клеток обоих микробов обусловлена угнетением их окислительных функций.

В настоящее время, несмотря на то, что окислительные процессы у бактерий изучены недостаточно полно, можно считать установленным, что облигатные анаэробы имеют только одну возможность окисления, а именно дегидрирование органических субстратов по схеме:

анаэроб: субстрат H_2 + акцептор → акцептор H_2 + субстрат.

Так как при дегидрировании органических субстратов реакции между донаторами и акцепторами водорода катализируются энзимами, которые содержатся в клетке и восстанавливаются донатором и вновь окисляются акцептором водорода, то окислительно-восстановительный потенциал этого биокатализатора — энзима должен лежать между окислительно-восстановительными потенциалами обеих систем.

Таким образом, анаэробная клетка может развиваться в среде, если Eh ее окислительно-восстановительных энзимов приближается к Eh пи-

тательной среды, которое обусловлено наличием в этой среде некоторых редуцирующих веществ (Fildes [4] и др.) и пр.

В настоящее время имеется мало данных о величине окислительно-восстановительного потенциала микробных клеток, но потенциал ряда систем, принимающих участие в тех или иных реакциях, более или менее изучен

Карпенко в нашей лаборатории показала, что Cl. Welchii способен дегидрировать некоторые углеводы, аминокислоты и другие соединения в присутствии различных акцепторов водорода (красок-индикаторов), отличающихся по величине E_0 (E_0 — величина окислительно-восстановительного потенциала индикатора, 50% которого находится в окисленной и 50% в восстановленной форме). Однако динамика изменения Eh среды зависит от значения E_0 акцепторов водорода (индикаторов).

Учтя это обстоятельство, а также и наши вышеприведенные наблюдения о необходимости более низкого окислительно-восстановительного потенциала для роста ослабленных форм Cl. Welchii, мы высказали предположение, что у этих последних форм нарушаются основные процессы, при помощи которых они получают необходимую для их жизни энергию, т. е. процессы дегидрирования органических субстратов. По нашим предположениям, нарушение этих процессов должно было выражаться в угнетении способности дегидрировать некоторые субстраты в системах с более высокими окислительно-восстановительными потенциалами.

Исходя из этих предположений, мы поставили перед собой задачу изучить дегидрирование различных органических веществ, могущих быть источниками энергии для ослабленных форм Cl. Welchii, в присутствии акцепторов водорода (красок-индикаторов), отличающихся по величине E_0.

Исследование дегидразной активности мы производили по методу Тунберга в несколько измененной нами модификации Фридеман — Голландера (Frideman — Hollander [5]).

Взвесь микробных клеток, дважды отмытая от среды фосфатным буферным раствором, вносилась в пробирки диаметром 0,8 см в количестве 4—5 млрд. клеток в 1 мл., субстраты ($M/_{10}$ — $M/_{20}$) — в количестве 0,5 мл, краски-индикаторы — в количестве 0,1 мл.

Буферный раствор, растворы испытуемых субстратов и индикаторов предварительно кипятились в течение 30 минут, pH смеси проверялось при помощи потенциометра. Перемешав содержимое пробирки, на него наслаивали тщательно промытый солевой агар (0,8% агара в фосфатном буферном растворе) и смеси помещали в водяную баню. В качестве индикаторов были взяты следующие краски:

1. Бриллиант-крезил-синия (1:1 000)	$E_0 = +47$ mV
2. Метиленовая синь (1:2 000)	$E_0 = +11$ »
3. Индигодисульфонат (индигокармин) (1:1 000)	$E_0 = -125$ »
4. Нейтральная красная (1:1 000)	$E_0 = -325$ »

Контролями служили: 1) те же смеси без взвеси бактерий (контроль субстрата), 2) те же смеси без субстрата (контроль взвесей бактерий).

Отмечалось начало изменения окраски индикатора (начало реакции), все переходы от окраски окисленной до полностью восстановленной формы индикатора (конец реакции).

В качестве донаторов водорода были применены: 1) углеводы, 2) кислоты, 3) спирты, 4) аминокислоты, 5) лецитин (см. таблицы 1 и 3).

Дегидрирование каждого субстрата изучалось при pH = 7,2; 7,4; 7,8; 8,0.

В ряде параллельных опытов было установлено, что оптимальной температурой для дегидрирования различных субстратов неповрежденными клетками Cl. Welchii является температура 39—40°. Эта темпе-

ратура оказалась оптимальной и для дегидразной активности ослабленных форм в отношении тех субстратов, которые они дегидрировали.

Культуры Cl. Welchii выращивались на МПБ (pH = 7,2).

18—20-часовая культура на этом бульоне центрифугировалась, осадок взвешивался в фосфатном буферном растворе (pH = 7,2) до густоты 500 млн. клеток в 1 мл, взвесь вносилась в узенькие пробирки (диаметром 0,5 см), которые запаивались и погружались в воду, нагретую до 80—81—82°. При этих температурах взвеси прогревались в течение 30 минут.

Прогретые взвеси оставлялись при комнатной температуре, затем засевались в количестве 1 млрд. клеток на среду Китт — Тароцци, на МПБ и на тот же бульон с добавлением того субстрата, который испытывался в последующем опыте дегидрирования в качестве донатора водорода.

Одновременно на те же среды высевалась и непрогретая взвесь микробных клеток.

В посевах на МПБ роста прогретых клеток не наблюдалось. В посевах на МПБ с испытуемым субстратом, если этот субстрат не являлся донатором водорода в реакции дегидрирования, как правило, тоже не наблюдалось роста прогретых клеток. На среде Китт — Тароцци культура нормально развивалась.

Культуры, выросшие на среде Китт — Тароцци, центрифугировались в течение 15 минут в градуированных центрифужных пробирках до постоянного объема (число оборотов центрифуги 4500) и дважды промывались буферным раствором. Полученный осадок вновь взвешивался в буферном растворе до густоты 4 млрд. клеток в 1 мл. Густота взвеси устанавливалась по стандарту, а также путем подсчета клеток в счетной камере. Таким образом, в каждый опыт вводилось одно и то же количество микробных тел, так как оно контролировалось: 1) объемом осадка, полученного при центрифугировании в мерной центрифужной пробирке, 2) подсчетом количества клеток в счетной камере, 3) сравнением с микробным стандартом.

Ряд опытов был поставлен с ослабленными культурами, выросшими на среде Китт — Тароцци после прогрева взвеси клеток до 80—81° в течение 30 минут. Полученные таким образом ослабленные формы Cl. Welchii (культуры №№ 235, 34 и 46) дегидрировали глюкозу очень медленно (через 4—6 часов) только с двумя индикаторами — индигокарминном и нейтральной красной.

С целью получить более четкие результаты мы начали прогревать взвеси наших культур Cl. Welchii (те же культуры №№ 235, 34 и 46) до 82° в течение 30 минут и все наши дальнейшие исследования проводили с ослабленными формами, выросшими на среде Китт — Тароцци из поврежденных таким образом клеток.

Большинство опытов ставилось во многих повторениях (до 5—10 раз). В каждом опыте наряду с ослабленными формами испытывались и нормальные формы (культуры, выросшие на той же среде из неповрежденных клеток).

Суммарные результаты нескольких исследований приведены в табл. 1.

Из этой таблицы видно, что все испытуемые нами углеводы, которые энергично дегидрировались культурами Cl. Welchii, выросшими на среде Китт — Тароцци из неповрежденных клеток, не дегидрировались культурами, выросшими на той же среде из клеток, прогретых до 82° в течение 30 минут. Не дегидрировались и другие субстраты — глицерин, лецитин, фумаровая кислота. Энергично дегидрировалась только аскорбиновая кислота, но неясно, в какой мере участвовали бактериальные клетки в реакции между аскорбиновой кислотой и индикатором.

В табл. 2 приводятся результаты опытов дегидрирования глюкозы и сахарозы нормальными и ослабленными формами Cl. Welchii при pH = 7,2 и 7,7.

Несмотря на то, что оба эти субстрата лучше дегидрируются нормальными формами Cl. Welchii при pH = 7,7, ослабленные формы не дегидрируют их и при этом pH.

Такие же результаты были получены и в отношении других субстратов (углеводов, спиртов и др.) и при pH = 8,0.

Испытание дегидразной активности нормальных и ослабленных форм Cl. Welchii в отношении аминокислот мы проводили при pH = 7,7.

Таблица 1

Скорость (в минутах) дегидрирования различных органических субстратов нормальными и ослабленными формами Cl. Welchii, выросшими на среде Китт—Тароцци

Субстраты / Индикаторы	Нормальные формы										Ослабленные формы									
	глюкоза	галактоза	фруктоза	мальтоза	лактоза	сахароза	глицерин	фумаровая к-та	аскорбиновая к-та	лецитин	глюкоза	галактоза	фруктоза	мальтоза	лактоза	сахароза	глицерин	фумаровая к-та	аскорбиновая к-та	лецитин
1. Бриллиант-крезил-синяя $E_0 = +47$ mV (при pH = 7,0)	5—15	5—10	30—45	15—30	40—55	5—15	2—5	∞	5—40	15—30	—	—	—	—	—	—	—	—	20—70	—
2. Метиленовая синяя $E_0 = +11$ mV (при pH = 7,0)	5—15	5—10	30—45	10—22	40—55	5—15	5—10	60—∞	5—40	15—30	—	—	—	—	—	—	—	—	20—70	—
2. Индигодисульфонат индигокармин $E_0 = -125$ mV (при pH = 7,0)	5—20	5—10	30—45	5—22	40—50	10—30	10—30	60—∞	40—120	25—65	—	—	—	—	—	—	—	—	∞	—
4. Нейтральная красная $E_0 = -325$ mV (при pH=7,0)	5—20	5—10	30—45	10—50	40—55	10—30	10—30	∞	40—120	45—120	—	—	—	—	—	—	—	—	∞	—

Примечание. pH реакции дегидрирования = 7,2; первое число обозначает начало реакции; второе—конец реакции; — отсутствие реакции; ∞ реакция наступила после 6 часов.

Таблица 2

Скорость (в минутах) дегидрирования глюкозы и сахарозы при различных pH нормальными и ослабленными формами Cl. Welchii, выросшими на среде Китт—Тароцци

pH / Индикаторы	Нормальные формы				Ослабленные формы			
	глюкоза		сахароза		глюкоза		сахароза	
	7,2	7,7	7,2	7,7	7,2	7,7	7,2	7,7
1	5—20	2—5	5—15	2—10	—	—	—	—
2	5—15	2—5	5—15	2—10	—	—	—	—
3	10—20	5—15	10—30	2—5	—	—	—	—
4	5—20	2—15	10—30	2—20	—	—	—	—

Суммарные результаты нескольких опытов дегидрирования ослабленными формами тех же культур Cl. Welchii некоторых аминокислот приведены в табл. 3.

Таблица 3

Скорость (в минутах) дегидрирования аминокислот нормальными и ослабленными формами Cl. Welchii, выросшими на среде Китт—Тароцци

Индикаторы	Нормальные формы						Ослабленные формы					
	d-аланин	аспарагин	аргинин	цистин	тирозин	глютаминовая к-та	*d*-аланин	аспарагин	аргинин	цистин	тирозин	глютаминовая к-та
1	50—80	15—40	—	—	∞	∞	—	—	—	—	∞	∞
2	80—300	15—40	—	—	∞	∞	—	∞	—	50—∞	∞	∞
3	70—120	40—150	90—∞	∞	∞	∞	40—75	70—∞	90—∞	50—∞	∞	∞
4	80—∞	90—∞		—	∞	∞	75—120	∞	∞	60—∞	∞	∞

Мы видим, что ослабленные формы Cl. Welchii, выросшие из поврежденных прогревом до 82° в течение 30 минут клеток на среде Китт — Тароцци, дегидрируют *d*-аланин, аргинин, аспарагин, цистин и другие аминокислоты, правда медленно, но доводят краски-индикаторы до лейкосоединений. Следует отметить, что и рост ослабленных форм даже на наиболее благоприятных для их развития средах происходит медленно.

Таким образом, из этой серии опытов мы могли сделать вывод, что у ослабленных форм Cl. Welchii угнетена способность дегидрировать большинство испытанных нами органических субстратов. Единственными источниками энергии, которые они могут использовать в условиях роста на среде Китт — Тароцци, являются, очевидно, такие аминокислоты, как *d*-аланин, аргинин, аспарагин и некоторые другие.

Можно думать, что ослабленные прогревом клетки Cl. Welchii при росте на среде Китт — Тароцци могут получать необходимую им энергию в реакции Stickland [7]. Он показал, что многие анаэробы получают необходимую им энергию за счет переноса водорода с одной аминокислоты на другую и могут расти на средах, практически содержащих только аминокислоты.

Как известно, дегидразы, катализирующие перенос водорода, являются адаптивными ферментами, каталитическая активность которых в очень значительной степени зависит от среды, в которой микроб растет и размножается.

С целью выяснить, восстанавливают ли ослабленные формы утраченную способность дегидрировать углеводы при выращивании в средах с этими углеводами, были поставлены следующие опыты.

1. Прогретые до 82° в течение 30 минут клетки Cl. Welchii высевались на среду Китт — Тароцци, к которой добавлялась глюкоза, галактоза или сахароза. После 24 часов роста культура тщательно отмывалась от среды буферным раствором. Дегидразная активность клеток испытывалась на глюкозе, галактозе и сахарозе. Результаты этих опытов представлены в табл. 4.

Таблица 4

Скорость (в минутах) дегидрирования углеводов ослабленными формами Cl. Welchii после роста в средах с добавлением этих углеводов

Субстраты / Индикаторы	Среда Китт—Тароцци с добавлением					МПБ + 0,5 мл 0,5% Na_2SO_3 + +1,0% глюкозы
	глюкозы		галактозы		сахарозы	
	глюкоза	галактоза	галактоза	глюкоза	сахароза	
1	5—15	10—20	5—10	5—10	5—10	—
2	5—10	10—20	5—10	5—10	5—10	—
3	5—10	5—20	5—20	5—25	5—20	30—45
4	10—15	5—20	5—20	5—20	5—25	30—45

Мы видим, что поврежденные прогревом клетки Cl. Welchii, выросшие на среде Китт — Тароцци с углеводами, полностью восстанавливают способность дегидрировать эти углеводы, причем эта способность восстанавливается не только в отношении того углевода, на котором культура росла, но и в отношении других углеводов.

2. Ослабленные культуры, выросшие на среде Китт — Тароцци с углеводами и, как было указано выше, обладающие способностью дегидрировать эти углеводы, пересевались на обычный МПА или на этот бульон с добавлением различных количеств этих же углеводов, или на полужидкий бульон (с добавлением 0,15% агара).

Это делалось с целью выяснить, смогут ли ослабленные формы, адаптировавшиеся к углеводам на среде Китт — Тароцци, развиваться на такой среде, как МПБ с добавлением этих углеводов (как указывалось выше, поврежденные прогревом клетки Cl. Welchii не росли на МПБ с глюкозой и другими углеводами). Как видно из табл. 5, при пересевах из среды Китт — Тароцци с глюкозой на МПБ с глюкозой роста культур Cl. Welchii не наблюдалось, в то время как на полужидких средах был хороший рост. Последнее обстоятельство говорит о том, что отсутствие роста на жидком МПБ с глюкозой не может быть объяснено повышенной чувствительностью ослабленных форм к кислотам, образующимся из углеводов.

Аналогичные результаты были получены в опытах, где, вместо глюкозы, к бульону добавлялась галактоза или сахароза.

Эти опыты дали нам основание считать, что условия в МПБ или в бульоне с углеводами создаются настолько неблагоприятные для дегидразной активности, что ослабленные формы, даже если они были проведены через среду Китт — Тароцци с углеводами, не могут к ним приспособиться. Нашими предшествовавшими работами было установле-

Таблица 5

Рост ослабленной формы культуры № 235 на средах после адаптации к глюкозе на среде Китт—Тароцци

Среда / Культура	МПБ	МПБ + глюкоза				МПБ + 0,15% агара	МПБ + 0,15% агара + глюкоза			
		1%	0,5%	0,25%	0,1%		1%	0,5%	0,25%	0,1%
№ 235 (ослабленная форма)	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Рост, газ	Рост	Рост, газ	Рост, газ	Рост, газ

но, что таким неблагоприятным условием является окислительно-восстановительный потенциал этих сред. Восстановление способности дегидрировать углеводы после роста в среде Китт — Тароцци с добавлением этих углеводов могло, как нам казалось, осуществиться главным образом благодаря тому, что в этой среде легко устанавливается благоприятный для роста ослабленных форм низкий окислительно-восстановительный потенциал.

3. Чтобы окончательно убедиться в этом, мы должны были исключить влияние питательных и ростовых веществ, вносимых с кусочками печени в среду Китт — Тароцци. С этой целью мы засевали прогретые клетки Cl. Welchii на такую среду, которая отличалась от глюкозного МПБ только наличием редуцирующих веществ. Такой средой является этот же бульон, к которому добавлялся 0,5% раствор Na_2SO_3. Выросшие на этой среде ослабленные формы дегидрировали, как это указано в табл. 4, глюкозу только с теми индикаторами, величина E_0 которых имеет отрицательное значение.

Нам кажется, что эти опыты полностью подтвердили наше предположение, что у поврежденных прогревом клеток Cl. Welchii повреждается способность дегидрировать некоторые субстраты (углеводы и пр.) в условиях окислительно-восстановительных систем с высокими (положительного значения) потенциалами.

4. Установив факт адаптации ослабленных форм Cl. Welchii к углеводам в средах с низкими окислительно-восстановительными потенциалами, мы поставили аналогичные исследования и с другими субстратами. Из этих субстратов особый интерес представлял для нас лецитин, так как известно, что патогенные свойства Cl. Welchii частично обусловлены активностью его ферментов в отношении этого вещества (α-токсин). В наших опытах лецитин, добавленный к среде Китт — Тароцци, угнетал рост не только ослабленных, но и нормальных форм Cl. Welchii. Ослабленные формы, утратив способность дегидрировать лецитин (табл. 1), не только не восстанавливают этой способности в наиболее благоприятной среде (среда Китт — Тароцци, к которой добавлен лецитин, pH среды = 7,7), но и совсем не растут на этой среде.

Этот вопрос требует дальнейших исследований.

Сведя все данные по изучению дегидразной активности ослабленных форм Cl. Welchii в отношении различных органических субстратов в условиях определенных окислительно-восстановительных систем, учтя потребности этого микроба в ростовых и пластических материалах, мы попытались составить синтетическую среду, которая, по нашим представлениям, могла бы представить все условия для роста ослабленных форм этого вида.

Как указывалось выше, ослабленные формы Cl. Welchii лучше дегидрируют доступные им субстраты при pH = 7,7.

Солевой состав синтетической среды был следующий: KH_2PO_4 — 0,24 г; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 5,76 г: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,02 г; воды дестиллированной 1000 мл; pH = 7,7.

К этому раствору были добавлены следы металлического железа, которое, по нашим исследованиям (Липшиц), способствует процессам метаболизма ослабленных форм Cl. Welchii.

Так как из аминокислот лучше всего дегидрировались аргинин и *d*-аланин, то мы ввели эти две аминокислоты в качестве пластического и энергетического материала.

Так как нам было известно (на основании наших исследований), что глюкоза может быть использована ослабленными формами Cl. Welchii только в средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом, то мы в среду № 1 (см. ниже) добавили и глюкозу, но для снижения окислительно-восстановительного потенциала была добавлена аскорбиновая кислота в количестве 0,01%.

Донаторами водорода в условиях нашей среды могли быть аминокислоты и глюкоза. Самым подходящим акцептором водорода, по нашим данным, для этих донаторов является краска-индикатор — индигокармин (табл. 1, 2, 3).

Исходя из этого, мы добавили в качестве акцептора водорода раствор этой краски (1 : 1000).

Наконец, по данным Tamura, Tytell, Boyd и Logan [8], Cl. Welchii нуждается в качестве ростовых веществ в пантотеновокислом кальции и пимелиновой кислоте. Эти авторы составили весьма сложную синтетическую среду для выращивания Cl. Welchii. По их же данным, рибофлавин и никотиновая кислота усиливают токсинообразование Cl. Welchii. Так как мы не располагали пимелиновой кислотой, то мы ввели в нашу среду только пантотеновокислый кальций. Учтя то обстоятельство, что при прогреве у клеток Cl. Welchii поражаются, очевидно, пиридин-протеиновые дегидразы, в состав которых входит никотиновая кислота, мы ввели и ее в синтетическую среду, кроме того, был введен и рибофлавин.

Состав синтетических сред для ослабленных форм:

Среда № 1		Среда № 2
KH_2PO_4	0,24 г	То же, что среда № 1,
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	5,76 »	но без глюкозы
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 »	
Следы железа		
d-аланин	0,5%	
Аргинин	0,5 »	
Глюкоза	1,0 »	
Аскорбиновая к-та	0,01 »	
Пантотеновокислый кальций	2 г в мл	
Рибофлавин	0,2 г в 1 мл	
Никотиновая к-та	5 г в 1 мл	
Индигодисульфонат (1 : 1000)	0,2 мл на каждые 3 мл среды	
Воды дестиллированной	1000 мл	

Среды разливались в узенькие пробирки по 3 мл, затем кипятились в течение 30 минут, и после засева прогретыми клетками Cl. Welchii на содержимое пробирок наслаивался солевой агар (см. выше методику дегидрирования).

Для получения взвеси прогретых клеток культуры Cl. Welchii выращивались на МПБ, от которого они отмывались центрифугированием, прогревались, как описано выше, и взвешивались в фосфатном буферном растворе. В синтетические среды взвесь микробных клеток засевалась в количестве 500 млн.

Приводим опыт выращивания наших ослабленных форм Cl. Welchii на этих синтетических средах.

Опыт от 6/II 1948 г.

Синтетические среды	Взвесь непрогретых клеток культуры (250 млн.)	Взвесь прогретых до 82° в течение 30 мин. клеток (500 млн.)
№ 1	Рост с газообразованием, полная редукция индикатора. В мазках типичная палочка	Рост без образования газа, полная редукция индикатора. В мазках наряду с типичными палочками длинные извитые нити
№ 2	Рост, слабое образование газа, полная редукция краски. В мазках много спор	Рост небольшой, значительная редукция индикатора. В мазках типичные палочки
Контроль (среда № 1 без индикатора)	Нет роста	Нет роста

Из приведенного видим, что среда, составленная в основном на основании наших исследований, оказалась вполне пригодной для выращивания требовательных к условиям культивирования ослабленных форм Cl. Welchii.

Это лучше всего подтвердило правильность выводов, полученных нами на основании наших исследований о значении окислительно-восстановительного потенциала для активности дегидраз ослабленных форм Cl. Welchii.

Выводы

1. Поврежденные прогревом до сублетальной температуры клетки Cl. Welchii и выросшие из них на среде Китт — Тароцци ослабленные формы утрачивают дегидразную активность в отношении углеводов, некоторых кислот, лецитина.

2. Ослабленные формы, выросшие из поврежденных клеток Cl. Welchii на среде Китт — Тароцци, сохраняют дегидразную активность в отношении аскорбиновой кислоты и некоторых аминокислот.

3. Можно думать, что ослабленные формы Cl. Welchii на среде Китт — Тароцци получают необходимую энергию в реакции Стикленда.

4. Ослабленные формы Cl. Welchii могут восстанавливать утраченную способность дегидрировать некоторые углеводы, адаптируясь к средам, в которых легко осуществляется перенос водорода (в средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом).

5. Приведенные данные подтверждают нашу гипотезу об угнетении у поврежденных прогревом клеток Cl. Welchii способности дегидрировать некоторые субстраты в условиях окислительно-восстановительных систем с высокими потенциалами.

6. Нами составлена синтетическая среда для выращивания поврежденных прогревом клеток Cl. Welchii.

Институт микробиологии им. Заболотного
Академии Наук УССР
Киев

Получено 16.VI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Липшиц В. В. Условия выращивания ослабленных форм Cl. Welchii Holland. Диссертация, 1948.
2. Френкель Г. М. Выращивание ослабленных форм стафилококков Staphylococcus pyogenes. Микробиология, т. XVI, вып. 1, 1947.

3. Френкель Г. М. Ослаблені форми Streptococcus lactis. Мікробіологічный журнал АН УССР, т. IX, вып. 2, 1948.
4. Fildes. Труды 2-го конгресса микробиологов в Лондоне, 1936.
5. Friedeman and Hollander. Цит. по Umbreit, Burris and Stauffer. Manometrie tecnique and related methods for the study of tissue methabolism, p. 126, 1946.
8. Tamura, Tytell, Boyd and Logan. Цит. по Porter. Bacterial chemistry changes in environment on resting bacteria. Biochem. J., v. 21, p. 148, 1927.
7. Stickland. The chemical reactions by which Cl. sporogenes obtains its energy. Biochem. J., v. 28, p. 1746, 1934.
8. Tamura, Tytell, Boyd and Logan. Цит. по Porter. Bacterial chemistry and physiology, p. 713, 1946.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЗОТОБАКТЕРА

Е. А. Штерн

Изучение антигенной характеристики микробов составляет один из весьма существенных разделов в медицинской микробиологии, так как с этой характеристикой связаны самым тесным образом вопросы иммунитета. Этим следует, повидимому, объяснить, что для непатогенных бактерий в общей микробиологии, где проблема иммунитета для человека и животных отпадает, серологические особенности микробов почти не изучаются.

Нам кажется, однако, что такой анализ заслуживает внимания и в этой области.

Антигенная характеристика микробов может явиться (как это показано на ряде примеров из медицинской бактериологии) важным моментом в вопросах микробной систематики. Вместе с тем применение серологического анализа в общей микробиологии для некоторых объектов с более сложной организацией и циклом развития, чем у патогенных микробов, может вскрыть ряд закономерностей, весьма существенных для обобщения данных медицинской бактериологии. Таким образом, изучение антигенной характеристики сапрофитов могло бы обогатить как общую, так и медицинскую микробиологию.

Эти соображения легли в основу исследований, проводимых в лаборатории общей микробиологии нашего отдела.

Серию работ по изучению серологических особенностей непатогенных бактерий мы начали с азотобактера.

Выбор этого объекта объясняется полиморфизмом его клеточных форм, своеобразным циклом развития, наличием жгутикового аппарата и капсульных стадий покоя, а также невыясненностью филогенетического сродства азотобактера с другими микроорганизмами.

Первая серия наших опытов проводилась с музейными культурами, причем в нашем распоряжении имелось четыре культуры Azotobacter chroococcum (№№ 12, 16, 53 и 54), один — Azotobacter agile и два Azotobacter Vinelandii.

Все перечисленные культуры, за исключением культуры № 54, были получены из Всесоюзного института сельскохозяйственной микробиологии. Одна культура Az. Vinelandii и культура № 54 Az. chroococcum были взяты из Микробиологического института Академии Наук СССР. Для всех серологических исследований азотобактер выращивался на среде Эшби при температуре 26—28°.

Иммунизация кроликов проводилась культурами Az. chroococcum (№ 12 и 53), Az. agile (№ 5) и Az. Vinelandii (культура Микробиологического института Академии Наук СССР).

Кролики иммунизировались интравенозно взвесью живых микробов (48-часовая культура) в физиологическом растворе.

Иммунизация проводилась двумя циклами с промежутками между ними в 8 дней и в 4 дня между инъекциями. В первом цикле вводилось 50—100—500—1000 млн. микробов; во втором цикле в первый и второй раз — по одному, а в третий и четвертый раз — по два миллиарда. Кролики обескровливались на 8-й день после последней инъекции.

Изучение серологических особенностей азотобактера было начато с опытов перекрестной агглютинации.

Специфичность реакции проверялась не только контролями на физиологическом растворе, но и с нормальной сывороткой неиммунизированного кролика, а также с двумя чуждыми сыворотками, полученными при иммунизации кроликов — Staphylococcus aureus № 238 и Proteus vulgaris [1].

Результаты перекрестных агглютинационных опытов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Опыт перекрестной агглютинации

Живые культуры	Сыворотки							
	Az. chroococc. 53	Az. chroococc. 12	Az. agile	Az. Vinelandii	Контроль	Staphylococc. aureus 298	Proteus vulgaris	Нормальная сыворотка
Az. chroococcum 53	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
Az. chroococcum 12	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
Az. chroococcum 16	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
Az. chroococcum 54	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
Az. agile	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
Az. Vinelandii	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—

Примечание. +++ агглютинация до титра; ++ агглютинация в пределах $^1/_2$—$^1/_4$ титра; — отрицательный результат.

Как видно, реакция агглютинации для культур азотобактера специфична: они не реагируют ни с нормальными, ни с чуждыми иммунносыворотками.

Обе сыворотки Azotobacter chroococcum, а также сыворотка Azotobacter agile агглютинировали полностью все взятые в опыт культуры, в том числе и Azotobacter Vinelandii.

При этом сыворотка Az. Vinelandii агглютинировала хорошо лишь собственную культуру, остальные же культуры реагировали с нею слабо.

Для уточнения серологических отношений между изучаемыми культурами были проведены опыты адсорбции агглютининов по методу Кастеллани (Castellani).

Как известно, метод Кастеллани заключается в насыщении иммунносывороток гомологичными и гетерологичными культурами бактерий с последующей постановкой с такой истощенной сывороткой перекрестной реакции агглютинации.

В наших опытах методика насыщения сыворотки различными культурами азотобактера состояла в следующем: густо засеянные чашки (возраст культуры 48 часов) смывались физиологическим раствором. Полученная взвесь, содержащая $150 \cdot 10^9$—$250 \cdot 10^9$ микробов в 1 см^3 центрифугировалась, и на измеренный бактериальный осадок наливался равный объем сыворотки в разведении 1/25. Тщательно растертая в сыворотке культура помещалась на 2 часа в термостат при температуре 37° и затем на 16—18 часов на ледник. На следующий день эта жидкость центрифугировалась и освобожденная от бактерий сыворотка испытывалась в ориентировочном агглютинационном опыте с той культурой азотобактера, которой истощалась эта сыворотка. Если реакция агглютинации не наступала даже при небольших разведениях (1 : 100—1 : 200), сыворотка, очевидно, была истощена. При положительной реакции агглютинации приходилось повторно истощать сыворотку.

В некоторых опытах при наличии большого количества слизи и невозможности отцентрифугировать бактериальный осадок засеянные чашки смывались не физиологическим раствором, а иммунносывороткой в разведении 1/10 и 1/25. Наступающая при этом реакция агглютинации помогает отцентрифугировать даже слизистые культуры.

Каждая сыворотка истощалась шестью культурами, т. е. из одной сыворотки получалось шесть различно обработанных сывороток. Всего же было получено 24 сыворотки, с которыми были испытаны все культуры.

[1] Сыворотки были любезно предоставлены мне М. А. Зеликиной и М. О. Каневской.

Результаты опытов приведены в табл. 2. Из таблицы видно, что обработка сыворотки Az. chroococcum любой культурой Az. chroococcum, а также культурой Az. agile полностью истощает их в отношении этих культур, реакция агглютинации не наступает.

Однако после обработки сывороток Az. Vinelandii продолжали агглютинировать остальные 5 культур.

Что же касается сыворотки Az. Vinelandii, то она целиком истощалась как гомологичными культурами, так и остальными культурами азотобактера.

Таким образом, эти опыты указывали на то, что Az. Vinelandii отличается от остальных культур азотобактера и в антигенном отношении беднее остальных культур. Последнее вытекало из того, что Az. Vinelandii не истощал сывороток Az. chroococcum, тогда как при обратной постановке опытов имело место полное истощение сыворотки этого микроба.

Как видно из табл. 2, сыворотка Az. agile полностью истощалась при обработке культурами Az. chroococcum. Следовательно, она не содержала каких-либо дополнительных агглютининов, рецепторы к которым не были бы представлены у Az. chroococcum. Однако при насыщении сыворотки Az. agile гомологичной культурой был получен, казалось бы, парадоксальный результат: сыворотка полностью истощалась в отношении гомологичной культуры, но продолжала агглютинировать культу-

Таблица 2

Опыт насыщения по Кастеллани живыми культурами

Сыворотки	Az. chroococcum 53					Az. chroococcum 12					Az. agile					Az. Vinelandii				
Живые культуры	Насыщение																			
	Az. chroococcum				Az. agile	Az. Vinelandii	Az. chroococcum				Az. agile	Az. Vinelandii	Az. chroococcum				Az. agile	Az. Vinelandii	Az. chroococcum			
	53	12	16	54			53	12	16	54			53	12	16	54			53	12	16	54
Az. chroococcum 53																						
» 12																						
» 16																						
» 54																						
» agile																						
» Vinelandii																						

ры Az. chroococcum. Это заставляло признать, что сыворотка «Agile» содержит более богатый набор агглютининов по сравнению с рецепторным набором культуры. Подобное явление наблюдается в том случае, когда один рецептор (или несколько) обладает только способностью вызывать продукцию антител в организме, но не связывает их in vitro.

Таким образом, в антигенной структуре Az. agile следует признать наличие полного антигена и дополнительно только продуцирующего, в то время как в культурах Az. chroococcum оба эти рецептора выступают как полные антигены.

Дальнейшие опыты заключались в изучении отдельно термостабильных антигенов и термолабильных. Для разрушения термолабильных агглютиногенов смытые физиологическим раствором 48-часовые культуры азотобактера прогревались в течение 2 часов в водяной бане при температуре 100°. Опыт перекрестной агглютинации с кипяченными культурами ставился так же, как с живыми.

В этом случае для всех культур наблюдалась положительная реакция агглютинации. Это заставляло предполагать, что все культуры азотобактера имеют общий термостабильный антиген.

Для выяснения вопроса об идентичности у культур азотобактера термостабильных антигенов были поставлены опыты абсорбции агглютининов, в которых сыворотки истощались кипяченными культурами и реакция агглютинации ставилась затем также с кипяченными культурами.

В этом случае сыворотки истощались полностью и после такой обработки не реагировали с кипяченными гомологичными и гетерологичными культурами. Отсюда можно сделать вывод, что термостабильный антиген у всех культур азотобактера одинаков.

Дифференцировка между термостабильными и термолабильными антигенами азотобактера проводилась в опытах абсорбции, причем каждая иммунносыворотка истощалась гомологичной кипяченой культурой, а затем испытывалась со своей же, но живой культурой

В этих опытах реакция агглютинации давала положительные результаты, что указывало на наличие отдельных термолабильных и термостабильных антигенов.

В следующей серии опыты ставились со свежевыделенными культурами Az. chroococcum (№№ 9_3 и 15) и соответствующими сыворотками [2].

Методика иммунизации, постановки реакции агглютинации и опытов абсорбции были те же.

Нас интересовало, во-первых, взаимоотношение между свежевыделенными культурами Az. chroococcum и музейными и, во-вторых, отношение между свежевыделенными культурами Az. chroococcum и музейными культурами Az. agile и Az. Vinelandii.

В этих опытах свежевыделенные культуры отчетливо реагировали со своими сыворотками и слабее с сыворотками, полученными при иммунизации музейными культурами. В свою очередь эти последние культуры агглютинировались сыворотками к свежевыделенным культурам значительно хуже, чем своими сыворотками. Кроме того, музейная культура не вполне истощала сыворотки, полученные при иммунизации свежевыделенными культурами. Эти данные давали основание предполагать наличие у свежевыделенных культур, кроме общих агглютиногенов, свойственных всем музейным культурам азотобактера, еще и добавочного, им одним принадлежащего специфического рецептора.

Изучение серологических особенностей свежевыделенных культур производилось сразу после их выделения. Спустя год после культивиро-

[2] Культура азотобактера № 9_3 была выделена из почв сада Института экспериментальной медицины, а № 15 из почв окрестностей Тернок (Ленинградской области).

вания на искусственных питательных средах свежевыделенные культуры потеряли свой добавочный рецептор и по строению своего агглютиногенного аппарата не отличались от других музейных культур.

Сыворотки, полученные при иммунизации свежевыделенными культурами, почти не агглютинировали культуры Az. agile и не реагировали с Az. Vinelandii. С другой стороны, свежевыделенные культуры Az. chroococcum слабо агглютинировались сыворотками «Agile» и «Vinelandii».

Таким образом, в этом случае серологические отличия между Az. chroococcum, agile и Vinelandii оказались более отчетливыми, чем в опыте с музейными культурами.

Дальнейшие опыты состояли в анализе культур разных возрастов, а именно: двухсуточных и старых — двухмесячных.

Было установлено, что в агглютинационном опыте молодые культуры агглютинировались гомологичной сывороткой до титра, старые же — ниже титра.

Живые молодые культуры истощали гомологичную сыворотку как для молодых, так и для старых культур. Наоборот, старые культуры истощали сыворотку только для себя, но не для молодых культур (табл. 3).

Таблица 3

Опыты агглютинации с живыми культурами

Культуры Az. chroococcum	Сыворотка Az. chroococcum		
	Необработанная	Истощенная двухсуточной культурой Az. chroococcum	Истощенная двухмесячной культурой Az. chroococcum
Двухсуточная	+++	—	++
Двухмесячная	++	—	—

В табл. 3 приведены результаты опытов для 53 культур Az. chroococcum с гомологичной сывороткой до и после ее обработки соответствующими культурами. Точно такие же результаты получены для Az. agile и Az. Vinelandii.

При насыщении сывороток кипяченными молодыми и старыму культурами в обоих случаях реакция агглютинации давала с кипяченными культурами отрицательные результаты.

Это говорило о наличии общих стабильных агглютиногенов для молодых и старых культур азотобактера и исчезновении при старении культур одного или нескольких лабильных рецепторов, которые следовало отнести за счет слизистой капсулы.

В итоге можно схематически представить себе строение рецепторного аппарата у азотобактера следующим образом (обозначения, конечно, условные; см. таблицу на стр. 450).

Как видно, для всех культур азотобактера имеется общий термостабильный антиген (в схеме *b*). Это вытекает из того, что каждая из сывороток агглютинировала все культуры после двухчасового кипячения. Однако способность термостабильного антигена вызывать образование антител различна и, повидимому, наименьшая у свежевыделенных культур, обладающих мощным термолабильным антигенным аппаратом, который «маскирует» стабильный антиген. Это подтверждается тем, что сыворотка от свежевыделенных культур реагирует с кипяченными культурами слабее, чем остальные сыворотки.

Наименование культуры	Стабильные антигены	Лабильные антигены
Свежевыделенные культуры Az. chroococcum	*b*	*a, c, d, e, f*
Музейные культуры Az. chroococcum	*b*	*a, c, d, e*
Старые музейные культуры Az. chroococcum	*b*	*a, c, d*
Музейные культуры Az. agile	*b*	*a, c* (*d*), *e*
Музейные культуры Az. Vinelandii	*b*	*a*

Для культуры Az. Vinelandii следует принять еще наличие термолабильного рецептора *a*, так как после обработки сыворотки кипяченой гомологичной культурой она агглютинировала живых микробов.

Рецептор *a* является общим для всех культур, чем и объясняется, что Az. Vinelandii агглютинировался всеми сыворотками.

У свежевыделенных культур рецептор *a* выражен слабо, так как они почти не реагировали с сывороткой «Vinelandii», а сыворотки свежевыделенных культур не агглютинировали культур Az.Vinelandii.

Культура Az. agile имеет, помимо рецептора *a*, рецептор *c*, общий с культурами Az. chroococcum и отсутствующий у Az. Vinelandii. Такой вывод вытекал из того, что сыворотки Az. chroococcum и Az. agile, истощенные культурой Az. Vinelandii, продолжали агглютинировать культуры Az. chroococcum и agile.

Кроме того, как уже указывалось, в антигенном наборе Az. agile имеется неполный (только «продуцирующий») антиген *d*, который у культур Az. chroococcum выступает как полноценный (для обозначения этого рецептора в схеме применены скобки).

Свежевыделенные культуры Az. chroococcum имеют дополнительный антигенный комплекс, повидимому, за счет больших слизистых капсул. Этот комплекс, обозначенный в схеме *e, f*, редуцирован у музейных культур Az. chroococcum и Az. agile до *e* и вовсе отсутствует у старых культур.

Наличие у этих культур такого рецепторного аппарата следовало из того, что сыворотки от свежевыделенных культур реагировали лучше всего с гомологичными культурами, слабее — с музейными и еще хуже — со старыми культурами. Вместе с тем старые культуры полностью не истощали сыворотки музейных культур в отношении гомологичных культур.

Следует подчеркнуть, что при иммунизации кроликов свежевыделенными культурами доминировала ответная реакция на капсульные антигены (*e, f*), чем и объясняется слабое реагирование этих сывороток с культурой Az. agile.

Представленная схема отражает лишь те изменения в строении рецепторного аппарата, которые наблюдались для сравнительно небольшого количества обследованных нами культур. Возможно, что при большем количестве культур, в особенности свежевыделенных, удалось бы установить и большее разнообразие в строении рецепторного аппарата азотобактера.

Выводы

1. Методом рецепторного анализа удается вскрыть сложную антигенную структуру азотобактера.

2. Все изученные культуры этого микроба имеют общий термостабильный антиген.

3. Серологические особенности культур азотобактера обусловлены различиями в строении термолабильных и капсульных антигенов.

4. Наиболее сложное рецепторное строение установлено у культур Az. chroococcum. При этом у свежевыделенных культур значительную роль, повидимому, играют капсульные антигены, которые редуцируются в лабораторных условиях и утрачиваются у старых (двухмесячных) культур.

5. Серологический анализ не вскрыл каких-либо существенных различий между культурами Az. chroococcum и Az. agile.

6. Культуры Az. Vinelandii резко отличаются от всех остальных культур азотобактера, имея самый скудный антигенный аппарат.

Отдел микробиологии
Института экспериментальной медицины
Ленинград

Получено 2. X. 1947

ДРОЖЖЕВАЯ МИКРОФЛОРА ВИНОГРАДНОЙ ЯГОДЫ

А. М. Шумаков

В вопросе о дрожжевой микрофлоре виноградной ягоды до настоящего времени имеются неправильные представления, проистекающие главным образом от недостатков применявшейся при исследованиях методики.

Определения микрофлоры виноградной лозы производились многими исследователями, которые, как правило, пользовались методом выращивания организмов в чашках Петри на твердой среде. Только Пастер определял микрофлору микроскопированием смыва с поверхности ягод.

Pasteur обнаружил наличие винных дрожжей только на зрелых ягодах и отсутствие их на зеленых. Müller-Thurgau [1] при исследованиях 23/VIII обнаружил дрожжи на уже зрелых ягодах винограда сорта Бургундский ранний, тогда как на незрелых ягодах расположенного по соседству сорта Бургундский поздний они отсутствовали.

По Cordier [5], на ягодах вначале обнаруживается исключительно Dematium pullulans, при начале размягчения ягод появляются торула и дикие дрожжи, и только перед самым созреванием — настоящие дрожжи. По Descoffre [2], в июле встречается главным образом торула, в августе — апикулятусы, и только позже настоящие дрожжи. Vidal u Dujarric [10] 30/VIII, когда часть ягод начала уже размягчаться, закрыли 21 гроздь бумажными мешочками, в стенках которых было прорезано много мелких отверстий для аэрации. Сообранные 21/X грозди оказались совершенно лишенными живых дрожжей. Авторы заключают отсюда, что дрожжи вообще появляются на ягодах только к концу созревания.

К такому же выводу приходит Саенко [1] на основании двухлетнего изучения на южном берегу Крыма микрофлоры виноградных ягод, произведенного методом посева в сусло-агар смыва с поверхности ягод. По нашему мнению, вопрос о микрофлоре виноградной ягоды может быть решен только тогда, когда будут установлены источники и пути заноса организмов на ягоды.

Hansen [7] первый выдвинул положение, что основным местом обитания винных дрожжей в природе является почва, из которой они переносятся на сахарсодержащие плоды и в условия бродильных производств, интенсивно там размножаются и возвращаются обратно в почву в громадных количествах с остатками растительных тканей или отходами производств.

Berlese [4] констатировал, что дрожжи обнаруживались в верхних слоях садовых (до глубины в 10—12 см) и парковых (до 3—36 см) почв в течение апреля — июня. В июне количество их уменьшалось, а в июле они вообще не обнаруживались. Саенко [1], ссылаясь на исследования Вортмана и свои собственные, проведенные на южном берегу Крыма, считает установленным факт полного отмирания дрожжей в почвах в летние месяцы, под влиянием высокой температуры, высыхания, солнечных лучей. Дальнейшие выводы, обоснованные работами

[1] Цит. по Lafar [7], стр. 328.
[2] Цит. по Lafar [7], стр. 348.

Надсона, Berlese и собственными исследованиями Саенко, сводятся к тому, что главным местом обитания дрожжей на протяжении года является пищеварительный канал насекомых, в особенности дрозофилы, что почва — только временное их местообитание. Существенным методическим недочетом исследований Саенко было то, что не принималось мер к подавлению развития в разливках плесневых и других аэробных организмов, являющихся серьезными конкурентами дрожжей в желатиновых и агаровых средах. Проведенные нами в течение июля — октября исследования почвы виноградников Украинского института виноградарства (Одесский район) осуществлялись таким образом: стерильно отобранные образцы поверхностного слоя почвы вносились в количестве около 1 г параллельно в две пробирки со стерильным виноградным соком, из которых одна помещалась в термостат в штативе, а другая вносилась в стеклянную, закрытую пробкой банку, воздух в которой замещался CO_2. При каждом проводимом через декаду исследовании с трех участков бралось по 10 образцов почвы. На протяжении всего названного времени от 70 до 100% пробирок, находившихся в стеклянной банке, давали брожение, при котором микроскопический контроль показывал большое количество как апикулятусов, так и настоящих винных дрожжей. В то же время пробирки, находившиеся в обычной атмосфере, быстро зарастали плесенями. Только в единичных пробирках обнаруживалось вялое, поздно начавшееся брожение.

С этим согласуются результаты, полученные Тюниной (в районе Краснодара [3]). На протяжении всего года она обнаруживала в почве дрожжи, в отдельных случаях на глубине до 1 м. Прямые опыты Hansen [6] показали, что внесенные в почву дрожжи сохранялись там живыми в течение более чем трех лет.

Не исключая возможности проявления специфических условий на южном берегу Крыма, мы считаем на основании сказанного более универсальным взгляд Hansen, что почва — основное место обитания винных дрожжей в течение всего года, т. е. основной источник поступления их на виноградные ягоды.

Последнее иллюстрируется, в частности, числами, полученными Müller-Thurgau [4] при определении количества дрожжей и дрожжеподобных организмов на ягодах из верхних и из нижних, ближе расположенных к почве частей виноградного куста. Эти числа соответственно 29,5 и 143,2 млн. на 100 ягод.

Миграция дрожжей на ягоды осуществляется различными агентами (ветром, насекомыми, птицами, брызгами воды во время дождей и пр.), удельный вес которых различен при вариировании внешних условий.

Занесенные на поверхность ягод дрожжи не размножаются до тех пор, пока ягоды остаются неповрежденными. Под влиянием солнечных лучей и высушивания, особенно при высоких температурах, быстро отмирают не только вегетативные клетки, но и более, как правило, устойчивые споры всех микроорганизмов. Следовательно, в сухую солнечную погоду микрофлора неповрежденных виноградных ягод должна состоять в большей части из отмерших, в меньшей — из высушенных, ослабленных микроорганизмов (в том числе и дрожжей). По нашим определениям, произведенным в октябре, при средней влажности в течение нескольких предшествовавших дней на ягодах одного сорта винограда было 37%, а второго — 33% живых дрожжевых клеток по отношению к общему их количеству (определения произведены

[3] Цит. по Фролову-Багрееву [2], стр. 140.
[4] Цит. по Lafar [7], стр. 350.

окрашиванием клеток слабым раствором генциан-виолета после смывания их с поверхности неповрежденных ягод). При большей сухости воздуха и более высокой температуре процент живых дрожжевых клеток должен быть еще меньшим.

В какой степени названные факторы сказываются на отмирании дрожжевых клеток, видно из полученных нами чисел. Осадки жидких дрожжевых культур 8- и 15-дневного возраста наносились тонкими мазками на стекло, затем высушивались в темноте при температуре около 20°. До и после высушивания, а также после дальнейшего пребывания при различных внешних условиях производилось определение процента живых клеток окрашиванием раствором генциан-виолета 1 : 10 000. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Условия опыта	Дрожжи 8-дневного возраста			Дрожжи 15-дневного возраста	
	№ 3	№ 6	№ 59	№ 6	№ 59
До высушивания	80,4	79,4	83,7	82,7	67,7
После высушивания	9,3	10,6	8,5	7,5	6,5
Через сутки на рассеянном свете при комнатной температуре	2,7	6,0	2,4		
После нанесения дестиллированной воды и высушивания	1,6	3,6	2,1		
Через 3 суток на рассеянном свете при комнатной температуре				1,5	2,7
Через 3 суток на синем свете при комнатной температуре				0,28	0,29
Через 3 суток на солнечном свете при комнатной температуре				2,8	1,4
Через 3 суток в темноте при 28°				2,4	1,0

Конидии плесневых грибов в гораздо большей степени устойчивы по отношению к рассматриваемым условиям [3]. По этой причине, при одинаковых количествах попадающих на поверхность ягод дрожжей и плесневых грибов, соотношение между количествами живых клеток обеих этих групп быстро изменяется в пользу плесневых грибов. Но ведь занос клеток на поверхность ягод продолжается в течение всего периода роста и созревания ягод, следовательно, в течение всего этого периода на их поверхности должны обнаруживаться живые дрожжевые клетки. Между тем, как указывалось вначале, это не наблюдается. Причина лежит в состоянии организмов, находящихся на поверхности ягод, и в особенностях метода выращивания организмов на твердых питательных средах. Как сказано, живые микроорганизмы на поверхности неповрежденной ягоды находятся в высушенном ослабленном, неактивном состоянии. Известно, что если молодые, активные клетки, например дрожжей, после посева в благоприятную для них среду почти немедленно начинают размножаться, то старые, особенно высушенные, начинают размножение только после некоторого промежутка времени, тем большего, чем старее и более истощены клетки [8, 9].

В менее благоприятной среде, например желатине и особенно агаре, старые высушенные дрожжевые клетки часто даже вовсе не начинают размножаться. Наличие же конидий плесневых грибов, менее чувствительных ко всяким неблагоприятным влияниям по сравнению с дрожжами, увеличивает недостоверность результатов исследования, проводимого с помощью твердых сред. Развиваясь на них несравненно

быстрее дрожжей, плесневые грибы быстро обрастают поверхность среды. Обеднение среды кислородом и питательными веществами, обогащение ее продуктами обмена плесневых грибов, токсическими для других микроорганизмов, приводит к тому, что и клетки дрожжей, которые при отсутствии плесеней образовали бы колонии на твердой среде, прекращают размножение и даже отмирают.

Таковы, по нашему мнению, причины того, что на ранних этапах развития виноградных ягод упомянутые исследователи не обнаруживали дрожжей. Подтверждением правильности наших взглядов являются результаты следующих опытов.

Начиная с 23/VII по 7/XI на винограднике Украинского института виноградарства периодически срывались стерильным пинцетом и вносились в пробирки со стерилизованным виноградным соком по две здоровые, неповрежденные ягоды одного сорта, с того же участка. Каждый раз отбор производился в 15—20 пробирок, которые помещались в термостат. Через 18—20 часов содержимое пробирок энергично взбалтывалось и из каждой стерильно переносилось по 3—4 капли в другие пробирки с такой же стерильной средой. Эти новые пробирки помещались в большую стеклянную, закрытую пробкой банку, в которой воздух замещался углекислым газом.

В ряде случаев, особенно при ранних сроках отбора ягод, развитие дрожжей и брожение наблюдалось только в пробирках второй серии, тогда как соответствующие пробирки первой серии все зарастали плесенями, не дав заметного размножения дрожжей и брожения.

Приводим процент пробирок второй серии, в которых наблюдалось развитие дрожжей:

Время отбора ягод	23/VII	12/VIII	10/X	22/X (сбор винограда)	7/XI*
Процент пробирок, давших брожение . . .	7	20	73	80	100

* Образцы отобраны с оставленных на кустах гроздей.

Ясно видно, что живые дрожжи имеются, хотя и в небольшом количестве, на ягодах даже за три месяца до сбора винограда и что причины необнаружения их можно объяснить условиями на поверхности ягоды и особенностями применявшейся методики.

Косвенное подтверждение наших выводов можно видеть в результатах, приведенных Саенко в уже цитированной работе [1]. С 28/VI по 10/IX у нее получалось обильное развитие различных плесневых грибов на твердых средах, при полном отсутствии колоний дрожжей. Образец от 26/IX дал полное отсутствие колоний плесеней и первый раз значительное или большое количество дрожжевых колоний. Образцы от 6/X и 17/X из плесневых грибов дали только малое количество колоний Penicillium и одновременно — значительное или большое количество колоний дрожжей.

В пользу взглядов Müller-Thurgau, Cordier, Descoffre, Vidal et Dujarric, Саенко служат полученные ими результаты, по которым дрожжи при пользовании методом разливок обнаруживаются на ягодах только в момент их зрелости. Объяснение этого нетрудно найти в изменении условий на поверхности ягод перед и во время достижения ягодами зрелости.

Вполне понятно, что в конкретных условиях все виноградные ягоды никогда не остаются неповрежденными до момента сбора урожая. Рез-

кие изменения температуры и влажности, выклевывания птицами и уколы сосущих насекомых, иногда настолько тонкие, что не видны невооруженным глазом, учащающиеся с более частыми посещениями ягод, в связи с созреванием винограда, удары о твердые предметы при раскачивании ветром и т. д.,— все эти причины приводят к более или менее сильному обнажению мякоти ягод, к выступанию наружу клеточного сока. Создаются условия, необходимые дрожжам для перехода из состояния оцепенения к энергичной жизнедеятельности. Богатство клеточного сока питательными веществами имеет следствием быстрое размножение дрожжей в местах повреждений. В результате картина микрофлоры ягоды изменяется и числа, характеризующие наличие дрожжевых клеток на поверхности ягод, должны резко возрасти по той причине, что дрожжи не только не будут отмирать, но непрерывно количественно увеличиваться. Понятно, что такие энергично размножающиеся клетки дрожжей в культурах на твердых средах окажутся серьезными конкурентами плесневых грибов, способными вытеснять их, а не угнетаться ими. В этом надо видеть причину неправильного мнения о том, что винные дрожжи появляются только на зрелых виноградных ягодах.

Выводы

1. Основным местообитанием винных дрожжей в течение всего года является почва, из которой они заносятся различными агентами на поверхность ягод в течение всего периода развития последних.

2. Быстрое отмирание клеток дрожжей на поверхности неповрежденной ягоды за счет высушивания, действия солнечных лучей, высокой температуры приводит к преимущественному накоплению более устойчивых видов микроорганизмов, в первую очередь плесневых грибов.

3. Применявшийся для исследования микрофлоры виноградной ягоды метод выращивания на твердых средах дает настолько большие преимущества плесневым грибам перед находящимися в неактивном состоянии дрожжами, что последние вообще бывают не способны образовать заметные глазом колонии. Это и является причиной неправильных утверждений, что на зеленых ягодах дрожжи полностью отсутствуют.

4. Более частые посещения ягод в ходе их созревания птицами и насекомыми, обогащающие микрофлору ягод и увеличивающие механическое повреждение ягод, приводят к переходу неактивных микроорганизмов, в том числе и дрожжей, в активное состояние. При этом количество живых клеток дрожжей не только увеличивается, но и, благодаря переходу в активное состояние, они делаются энергичными конкурентами плесневых грибов при выращивании на твердых питательных средах. В этом причина (обнаруживаемого методом разливок) появления дрожжей на ягодах в момент их созревания.

Украинский Научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия
им. Таирова
Одесса, Люстдорф

Получено 4.III.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Саенко Н. Ф. К вопросу о круговороте дрожжей. Изд. Всесоюзного института виноградарства и виноделия, вып. 2, Тифлис, 1932.
2. Фролов-Багреев А. М., Рябченко И. М. и Клоц Э. Я. Микроорганизмы плодово-виноградных сусел и вин, стр. 140, Москва — Ленинград, 1933.

3. Унгурян П. Н. Penicillium glaucum в виноградном соке. Сб. работ по виноград. и технологии. Тр. Донской опытной станции по виноградарству и виноделию, т. IV, вып. 1—2, стр. 74, Ростов, 1936.
4. Berlese A. Verhalten der Saccharomyceten an den Weinstöcken. Реф. в Ctbl. Bact. II Abt., Bd. III, S. 592, 1897.
5. Cordier J. A. Цит. по Lafar [7].
6. Hansen E. Chr. Gesammelte theoretische Abhandlungen über Gärungsorganismen. S. 25, 78, 74, Jena, 1911.
7. Lafar F. Handbuch der technischen Mykologie. Bd. IV, S. 328; Bd. V, S. 348, Jena, 1905—1914.
8. Meissner R. Mikroskopische Bilder des Mostes und des Weines. S. 29, Stuttgart, 1923.
9. Tait A. et Fletcher L. Développement et nutrition de la levure. Ann. de la Brass. et de la Distill. No. 11, p. 161 et 179, 1927.
10. Vidal L. et Dujarric de la Rivière R. D'où viennent les levures? Et quand apparaissent-elles sur les grappes de raisin? Rev. de Viticulture, t. 92, p. 51, 1940.

ВЛИЯНИЕ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ПШЕНИЦЫ НА МИКРОФЛОРУ ПОЧВЫ

Ю. М. Возняковская

За последнее время в работах по почвенной микробиологии уделялось значительное внимание микрофлоре ризосферы сельскохозяйственных растений.

Изучение шло в двух направлениях: с одной стороны, выявлялось влияние микроорганизмов, размножающихся в зоне корневой системы растения, на его развитие (Исакова [2. 3], Красильников [4, 5], Шелоумова [8]), с другой стороны, определялась роль растения в отборе и размножении микрофлоры вблизи корней.

В последнем случае было отмечено селекционирующее действие корневой системы на различные группы почвенных микроорганизмов (Березова [1], Исакова [3], Красильников [6, 7], Katznelson [9], Starkey [10] и др.).

Красильников объясняет огромное влияние, которое оказывают растения на отбор, развитие и накопление микроорганизмов в почве, выделением корнями органических веществ, а также благоприятным изменением влажности и реакции среды.

Во многих случаях растению придается настолько ведущая роль в микробиологической жизни почвы, что те изменения в микрофлоре ризосферы, которые наблюдаются в результате различной обработки почвы, объясняются ее косвенным воздействием — воздействием на развитие растения. Чем мощнее развито растение и его корневая система, тем сильнее сказывается его влияние на микрофлору.

В данной работе представлены результаты изучения некоторых групп почвенных микроорганизмов в связи с влиянием на их размножение корневой системы пшеницы.

Влияние пшеницы на микрофлору почвы изучалось в условиях посевов озимой пшеницы сорта «Степь» на типичных прииртышских черноземах Омской области.

Пробы для микробиологических анализов брались с посевов пшеницы по стерне. При этом способе посева, в связи с посевом по невспаханному жнивью, наряду с корневой системой развивающейся пшеницы сохраняется мертвая корневая система пшеницы предыдущего посева.

Анализы ризосферы мертвых корней представляли интерес с точки зрения получения ответа на вопрос о значении корневых выделений растения для размножения микроорганизмов.

Образцы почвы и корней для анализа брались четыре раза в течение вегетационного периода: 1) в стадии кущения пшеницы; 2) в стадии выхода в трубку; 3) во время колошения; 4) во время созревания.

Методика взятия проб заключалась в следующем: в поле вырезались монолиты почвы на глубину залегания основной массы корневой системы. Наружный слой почвы удалялся, а из остальной путем тщательного перемешивания четырех образцов составлялась средняя проба. Результаты анализа такой пробы почвы сравнивались с результатами анализа корневой системы.

Корневая система бралась для анализа после стряхивания с нее почвы. При этом на корнях оставался плотно прилегающий слой поч-

венных частиц, который отделялся только после взбалтывания в бутылке со стерильной водой.

Пересчет количества микроорганизмов, полученных в результате анализа, производился на 1 г воздушно-сухой почвы, смытой с корней.

Учитывались следующие группы микроорганизмов:

1. Общее количество — высевом на 5% овсяный агар с добавлением 0,1% фосфорнодвукалиевой соли.

2. Денитрификаторы — по появлению NO_2 в жидкой среде, содержащей лимонно- и виннокислый натрий и нитратный азот.

3. Маслянокислые — на жидкой картофельной среде с 1% галактозы по появлению брожения.

4. Целлюлозоразлагающие — высевом соответствующих разведений на жидкую среду Гутчинсона в модификации Возняковской с фильтровальной бумагой. Учет производился через 15 суток по появлению пигментации и разъедания бумаги на границе с жидкостью.

5. Clostridium Pasteurianum — по появлению брожения на безазотистой среде Виноградского.

6. Грибы, которые выращивались на овсяном агаре, подкисленном молочной или лимонной кислотой.

7. Слизистые бактерии типа Achromobacter.

8. Актиномицеты.

Две последние группы подсчитывались на нитратном агаре (по Березовой).

К сожалению, в условиях проведения данной работы нельзя было проследить за влиянием корневой системы пшеницы на размножение азотобактера, так как в черноземе он отсутствовал.

Что касается нитрифицирующих бактерий, то они учитывались во всех анализированных образцах на кремнекислом геле по Виноградскому, но обнаруживались в незначительных количествах и разницы в их размножении в почве и в ризосфере не наблюдалось. Однако такой вывод относительно этой группы нельзя считать окончательным.

Вся работа по учету вышеуказанных групп микроорганизмов в почве, несколько удаленной от корневой системы пшеницы, а также в непосредственной близости живых и мертвых корней проводилась в течение двух лет. Пробы брались параллельно на двух полях. Во всех случаях были получены совпадающие результаты.

Для наглядности данные количественного учета микроорганизмов приводим в виде кривых.

Представленные на рисунках 1, 2, 3, 4 и 5 кривые отражают количество мироорганизмов в ризосфере живых и мертвых корней пшеницы, а также в почве, более удаленной от корневой системы. При этом ясно видно, что количество микроорганизмов близ живых корней развивающегося растения значительно превышает их количество в почве, несколько удаленной от корней.

Это говорит о том, что в ризосфере живых корней создаются условия, стимулирующие размножение как общего числа микроорганизмов, так и отдельных групп таких, как денитрифицирующие, маслянокислые, слизистые типа Achromobacter, а также в первую половину вегетации анаэробного фиксатора азота Clostridium Pasteurianum.

Что касается мертвых корней, то как показывают кривые, их присутствие не оказывает такого значительного влияния на размножение вблизи них микроорганизмов, какое оказывают живые корни. Только некоторые группы микроорганизмов находят на мертвых корнях подходящие условия для своего развития, и это отражается на их количестве. Так, целлюлозоразлагающие бактерии размножаются на мертвых корнях значительно сильнее, чем на живых (рис. 6). Это объясняется тем, что живые корни не являются подходящим материалом для

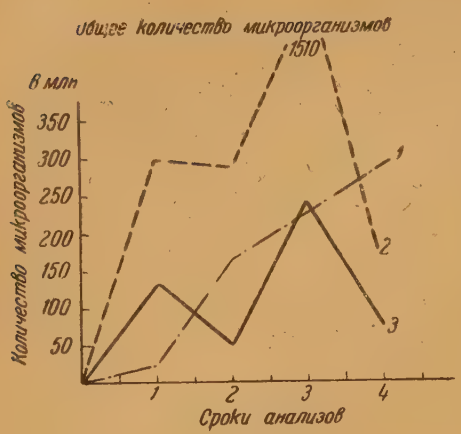


Рис. 1.

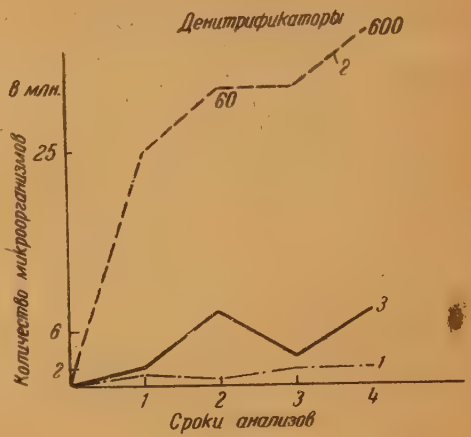


Рис. 2

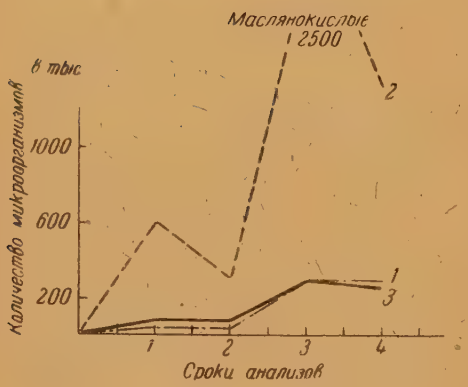


Рис. 3

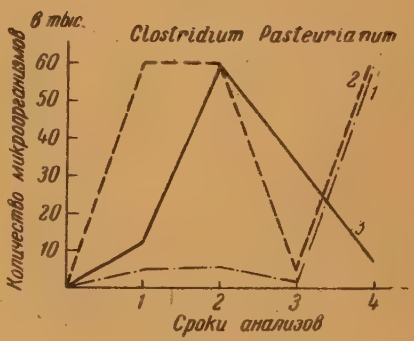


Рис. 4

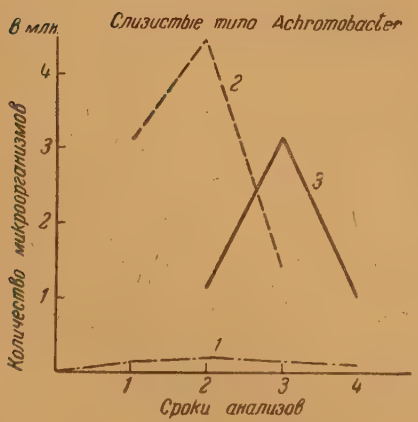


Рис. 5

Рис. 6

Обозначения на рис. 1—8: *1* — почва; *2*—корни живые; *3*—корни мертвые

разложения, в то время как мертвые, наоборот, представляют среду, богатую клетчаткой, поддающейся разложению.

Картина меняется к концу вегетационного периода, когда со старением корневой системы живого растения появляются отмирающие части корней и в связи с этим количество целлюлозоразлагающих бактерий резко увеличивается.

С размножением целлюлозных бактерий на мертвых корнях возможно связать и размножение на них Clostridium Pasteurianum (рис. 4).

В процессе разложения клетчатки накапливаются необходимые для клостридия безазотистые органические вещества, которые могут использоваться им как энергетический материал.

Следует отметить, что в более поздний период развития растения микрофлора, развивающаяся под влиянием живой корневой системы, несколько изменяется.

В этот период, как уже указывалось выше, начинается разложение отмирающих частей корневой системы, т. е. начинается процесс, который сводится к работе таких групп микроорганизмов, как целлюлозоразлагающие и грибы (рис. 6, 7), в связи с чем увеличивается их количество.

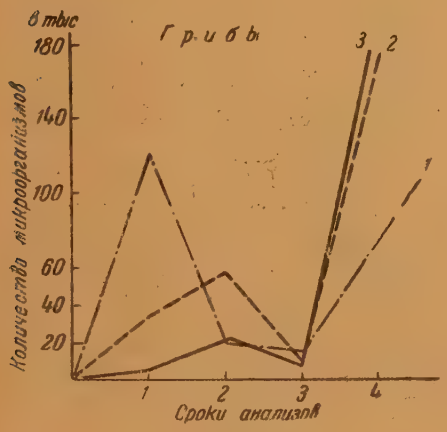


Рис. 7

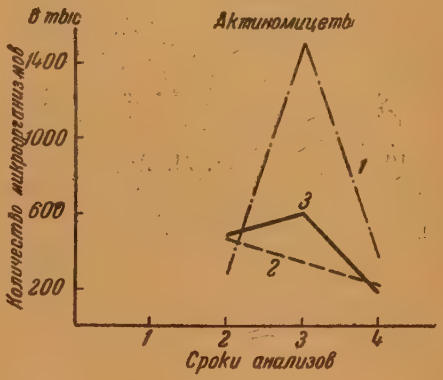


Рис. 8

Среди исследованных нами групп микроорганизмов, актиномицеты и грибы занимают особое положение. А именно: на их размножение не было отмечено влияния со стороны корневой системы. Как показывают кривые рис. 7 и 8, количество этих микроорганизмов в почве превышало их количество в ризосфере корневой системы. Грибы несколько больше размножались на корнях к концу вегетационного периода.

Выводы

1. Общее количество микроорганизмов в ризосфере живых корней значительно превышает их количество в почве и в ризосфере мертвых корней.

2. Живые корни пшеницы оказывают своими корневыми выделениями селекционирующее действие на такие группы микроорганизмов, как денитрифицирующие, маслянокислые, слизистые типа Achromobacter, Clostridium Pasteurianum.

3. В ризосфере мертвых корней пшеницы размножаются целлюлозоразлагающие микроорганизмы, которые участвуют в их разложении.

4. К моменту созревания растений — периоду «старения» корневой системы — в ризосфере начинают размножаться целлюлозоразлагающие бактерии и грибы.

5. Корневая система пшеницы не оказывает влияния на размножение актиномицетов и грибов.

5. Сравнение микробиологических показателей в ризосфере живых и мертвых корней пшеницы подтверждает наличие корневых выделений и их влияние на размножение ряда групп микроорганизмов.

Всесоюзный институт
сельскохозяйственной микробиологии
Московское отделение

Получено 27.V.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Березова Е. Ф. Взаимоотношения между бактериями ризосферы и растениями. Диссертация. (Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева). 1946.
2. Исакова А. А. К вопросу о воздействии бактериоиз на растения и его сущность. Тр. Ин-та физиологии растений АН СССР, т. 2, вып. 1, стр. 5, 1937.
3. Исакова А. А. Взаимоотношения между растениями и бактериями ризосферы. Диссертация. (Институт физиологии растений АН СССР). 1944.
4. Красильников Н. А. Влияние почвенных бактерий на рост пшеницы. Микробиология, т. VIII, вып. 5, стр. 523, 1939.
5. Красильников Н. А. Микробиологические основы бактериальных удобрений, Москва, 1945.
6. Красильников Н. А. Бактериальная масса ризосферы растений. Микробиология, т. XIII, вып. 4, стр. 144, 1944.
7. Красильников Н. А. Влияние растительного покрова на микробный состав в почве. Микробиология, т. XIII, вып. 5, 1944.
8. Шелоумова А. М. Азотоген. Микробиология, т. VI, вып. 8, стр. 1008, 1937.
9. Katznelson H. The «rhizosphere effect» of mangel on certain groups of soil microorganisms. Soil Sci., v. 62, No. 5, p. 343, 1946.
10. Starkey R. Some influence of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. Soil Sci., v. 27, p. 355, 1929; v. 32, p. 367, 1931.

АДСОРБЦИЯ МЕЛОМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

А. А. Имшенецкий и *Н. М. Авдиевич*

Исключительно быстрое развитие теоретической ферментологии составляет характерную особенность современной биохимии. Это не могло не отразиться на смежных дисциплинах, в частности и в микробиологии в последние годы стали детально изучаться ферменты микроорганизмов и условия их образования. При этом оказалось, что в практическом отношении применение ферментов грибов и бактерий имеет некоторые преимущества по сравнению с применением ферментов высших растений и животных. Выращивание микроорганизмов легко подчиняется воле экспериментатора, не зависит от случайных моментов и может происходить на малоценном непищевом сырье.

Уже имеется ряд работ, в которых описывается успешное применение ферментов грибов (Опарин и Яльцев [5], Сербинова [7], Попова [6], Фениксова и Сегаль [8]).

Для получения ферментативных препаратов очень удобны культуры термофильных бактерий — организмов, исключительно быстро размножающихся и накапливающих в культуре активные ферменты (Имшенецкий [2]).

Бактериальная культура как содержащая ферменты может быть применена непосредственно, однако сухие ферментативные препараты, полученные из жидкой культуры, несомненно, более перспективны. Они могут быть получены осаждением спиртом, солями (например, сернокислым аммонием) или высушиванием культуры. Эти методы имеют ряд недостатков — необходимо затрачивать большие количества спирта, солей или проводить их регенерацию, испарять большие количества жидкости при пониженном давлении и т. д. В связи с этим необходима дальнейшая разработка методов получения сухих препаратов ферментов. Способ, основанный на адсорбции ферментов каолином, дает иногда прекрасные результаты особенно в тех случаях, когда необходимо разделить ферменты. Укажем на исследования Вильштеттера и Грассмана с протеазами дрожжей, в которых методом адсорбции были разделены трипсин и полипептидаза дрожжей. Хорошие результаты дает также адсорбция бактериофага из жидких бактериальных культур, которая позволяет легко получать так называемый сухой бактериофаг (Крисс и Диденко [4]).

Наши исследования должны были выяснить возможность адсорбции и последующей элюции некоторых бактериальных ферментов.

Методика

Эксперименты были проведены главным образом с культурами термофильных бактерий. Из видов, образующих амилазу, была применена аэробная спороносная палочка, описанная ранее под именем Bact. diastaticus. Данные о ее морфологии и физиологии приведены в другой работе [3]. Выращивание бактерии производилось на 25% картофельном отваре с 0,25% пептона и 0,1% мела. Другой вид, в культуре которого также накапливалась амилаза, представляет собою термофильный вариант анаэробной маслянокислой бактерии, описанной Виноградским

как Clostridium Pasteurianum. Питательная среда для нее имела следующий состав: картофель (нарезанный кусочками) — 25 г, мела — 1 г, водопроводной воды — 100,0 см³. Культивировался анаэроб в колбах, содержащих среду, налитую высоким слоем. Как аэробный, так и анаэробный вид выращивался при 55—60°.

В качестве культуры, образующей протеазы, был взят термофильный организм Bact. thermoalimentophilus, изолированный и описанный в нашей лаборатории [1]. Посевы протеолитического вида производились на мясопептонный бульон обычного состава, налитый в колбы. Посевы выдерживались в термостате при 50—55°.

Для получения культур, содержащих пектиназу, в жидкие среды с кусочками картофеля засевался Bact. felsineus — организм, вызывающий мочку льна при относительно невысоких температурах. Культивировался Bact. felsineus при 37°.

В хорошо развившихся культурах бактерий определялась активность ферментов, а затем производилась адсорбция фермента мелом.

Бактериальные культуры фильтровались через бумажный фильтр, и в фильтрате определялась активность ферментов. Ранее было установлено, что фильтрация через мембранный фильтр, полностью освобождающая культуру от бактериальных клеток, и фильтрация через бумажный фильтр дают культуральную жидкость с одинаковой активностью амилазы и протеазы. Поэтому культуры амилолитических и протеолитических термофилов фильтровались только через бумажный фильтр. В опытах же с пектиназой предварительная фильтрация культуры Bact. felsineus производилась через мембранный фильтр № 12. Активность амилазы в культурах Bact. diastaticus и термофильного варианта Clostridium Pasteurianum устанавливалась по степени разжижения при 85° 10 см³ трехпроцентного крахмального клейстера, к которому добавлялся 1 см³ фильтрата культуры. Определение вязкости производилось с помощью вискозиметра Оствальда при 85°.

Активность протеаз выяснялась путем разжижения 8% водной желатины при 55° в течение 18 часов.

Для опытов с пектиназой была приготовлена картофельная мязга, содержащая пектин, разлагаемый Bact. felsineus. После 24-часового действия фильтрата культуры на картофельную мязгу в ней определялось содержание пектина по Са-пектату (метод Карре, видоизмененный Конрадом).

Адсорбция ферментов производилась путем фильтрации культуральной жидкости через слой мела. Для этого в стеклянный фильтр № 4 диаметром в 40 мм помещали 15 г мела, добавляли водопроводную воду, имевшую pH = 7,35, взмучивали мел, а затем воду отсасывали насосом. Реакция взмученного мела pH = 7,56. Высота слоя влажного мела 20 мм. Через полученную таким образом «колонку» мела пропускался порциями по 10 см³ фильтрат культуры.

Адсорбция ферментов

Схема опытов была следующей. В одной порции фильтрата культуры определялась активность фермента, затем фильтрат пропускался через слой мела и в прошедшей через мел жидкости снова устанавливалась активность фермента. Таким путем выяснялось, в какой степени адсорбируются ферменты. В дальнейшем мел высушивался и сохранялся как сухой ферментативный препарат. Такие исследования были проведены с амилазой термофильных бактерий Bact. diastaticus и Clostridium Pasteurianum, протеазой Bact. thermoalimentophilus, пектиназой Bact. felsineus. В табл. 1 приведены результаты этих опытов.

Эти данные позволяют утверждать, что мел полностью адсорбирует ферменты и культуральная жидкость, профильтрованная через «колон-

ку» мела, уже их не содержит. Исключительно активная амилаза термофильных бактерий, настолько разжижающая крахмал, что он вытекает из вискозиметра за 17—18 секунд (контроль 3 мин. 47 сек.), вся задерживается мелом. Так же быстро адсорбировались протеаза и пектиназа.

Однако опыты выяснили, что в этих условиях могут быть профильтрованы сравнительно небольшие объемы жидкости. Так, 15 г мела адсорбируют ферменты только из 20—30 см³ культуры. При увеличении количества культуры в профильтрованной жидкости вследствие недостаточной адсорбции могут быть обнаружены ферменты. Специально проведенные эксперименты выяснили, что высота слоя мела не изменяет этих соотношений. При высоте слоя мела в 200 мм, т. е. увеличении его в 10 раз, адсорбционная способность «колонки» увеличивается не пропорционально высоте слоя мела, а пропорционально весу мела. Если 15 г мела адсорбирует амилазу из 20 см³ культуры, то 50 г мела — из 65 см³ культуральной жидкости. Следовательно, увеличивая слой мела, нельзя добиться адсорбции ферментов из большего объема культуры.

Таблица 1

Адсорбция мелом бактериальной амилазы, протеазы и пектиназы

Амилаза

Скорость истечения крахмального клейстера в секундах *

Bact. diastaticus			Cl. Pasteurianum		
исходная культура	после фильтрации через мел	крахмальный клейстер (контроль)	исходная культура	после фильтрации через мел	крахмальный клейстер (контроль)
18	225	227	17	185	212

Протеаза

Разжижение желатины

Исходная культура	После фильтрации через мел
+++	—

Пектиназа

Содержание пектиновой кислоты в картофельной мязге

контроль		после обработки мязги культуральной жидкостью			
		содержащей пектиназу		из которой пектиназа адсорбирована мелом	
в г	в %	в г	в %	в г	в %
0,0695	13,754	0,00020	0	0,565	11,26
—	—	0,00025	0	0,520	10,35

* Цифры соответствуют среднему из 3 опытов.

Примечание. +++ полное разжижение; — отсутствие разжижения.

Теоретически при меньшем содержании белков в питательных средах для бактерий можно создать лучшие условия для адсорбции ферментов бактерий из культуральной жидкости и тем самым увеличить объем жидкости, пропускаемой через «колонку» из мела.

В связи с этим термофильная амилолитическая бактерия Bact. diastaticus выращивалась параллельно на 20% картофельном отваре, приготовленном на дрожжевой воде с добавлением 0,2% мела и 0,5% пептона, и на минеральной среде следующего состава: K_2HPO_4 — 0,1 г, $CaCO_3$ — 0,2 г, $MgSO_4$ — 0,05 г, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2 г, крахмал (нерастворимый) — 1,0 г, дрожжевая вода — 5 капель, водопроводная вода — 100,0 см³. Культуральная жидкость из культуры Bact. diastaticus, выросшей на первой среде, т. е. картофельном отваре, разжижала крахмальный клейстер за 40 секунд, а из культуры, развившейся на второй среде (минеральной), амилаза была менее активной и разжижение наступало через 75 секунд.

При фильтрации культуральной жидкости через «колонку», сделанную из 15 г мела, оказалось, что при выращивании бактерий на картофельном отваре удается пропустить через мел только 23 см³. Дальнейшее увеличение количества жидкости приводит к тому, что амилаза перестает адсорбироваться и может быть обнаружена после прохождения жидкости через мел. В противоположность этому при фильтрации через «колонку» мела культуры, выросшей на минеральной среде, можно пропустить 110 см³ и адсорбция амилазы еще продолжается. Таким образом, среды, обладающие значительной поверхностной активностью, непригодны для культивирования бактерий, ферменты которых должны быть в дальнейшем адсорбированы. Для этой цели могут быть рекомендованы минеральные среды, к которым добавляются необходимые для микроорганизма ростовые вещества.

Элюция ферментов

Адсорбированные мелом ферменты могут сохраняться, не теряя активности; в частности, сухой препарат амилазы через три с половиной месяца не изменил своей активности. Для элюции ферментов сухой ферментативный препарат в количестве 15 г растирался в ступке и переносился в стеклянный фильтр № 4. В фильтр наливалось 20 см³ водопроводной воды, мел взмучивался и вода отсасывалась насосом. В полученном фильтрате, имевшем pH = 7,69, определялась активность амилазы. Для этого фильтрат разводился водой в 10, 100 и 1 000 раз и 1 см³ каждого разведения, а также 1 см³ фильтрата без разведения прибавлялся, как обычно, к 10 см³ трехпроцентного крахмального клейстера. После 10-минутного гидролиза при 85° производилась вискозиметрия крахмального клейстера при 100°. Аналогичным образом определялась амилолитическая активность той культуральной жидкости, из которой производилась адсорбция амилазы. Эти определения служили контролем. Полученные данные приведены в табл. 2.

Таким образом, после элюции амилаза обладает той же активностью, что и в культуральной жидкости до адсорбции фермента. После адсорбции фермент может быть легко элюирован при простом взмучивании мела в воде и оба процесса — адсорбция и элюция — не приводят к значительному уменьшению активности фермента. Однако при обработке сухого ферментативного препарата, т. е. мела, адсорбировавшего фермент, таким количеством воды, которое соответствует объему культуральной жидкости, из которой адсорбировался фермент (в наших опытах 20 см³), не происходит элюции всей амилазы. При последующей обработке мела новыми порциями воды в элюате может быть обнаружен фермент, но в виде следов. При взмучивании мела вместо воды

Таблица 2

Активность амилазы Bact. diastaticus после элюции

Опыт (элюированный фермент)		Контроль (культуральная жидкость)	
Разведения	Время истечения крахмального клейстера из вискозиметра (в сек.)	Разведения	Время истечения крахмального клейстера из вискозиметра (в сек.)
Без разведения	17,8	Без разведения	18,0
1 : 10	20,0	1 : 10	18,2
1 : 100	68,4	1 : 100	62,5
1 : 1000	360,1	1 : 1000	370,0

может быть взят раствор $(NH_4)_2HPO_4$ в разведении 6 : 260, но по сравнению с водой эта обработка не дает преимуществ.

Что касается протеазы термофильных бактерий, адсорбированной мелом, то она так же легко элюируется водой и ее активность при этом не снижается.

Быстрое размножение, высокая биохимическая активность и возможность развития в больших объемах жидкости — несомненные преимущества бактерий. Эти моменты могут иметь большое значение при выборе организмов, являющихся источником того или иного фермента. Культура бактерий, содержащая гидролазы, может быть рассматриваема как наиболее простой ферментативный препарат. Однако жидкая консистенция и большие объемы культуры лимитируют возможности изготовления и применения таких препаратов. В связи с этим описанный в этой работе простой метод получения сухих ферментативных препаратов, возможно, представит некоторый интерес.

Выводы

1. Содержащиеся в бактериальных культурах ферменты могут быть адсорбированы путем фильтрации культуральной жидкости через слой мела. Этот метод дает возможность получить сухие препараты бактериальной амилазы, протеазы и пектиназы.

2. Выращивание бактерий на минеральных средах облегчает последующую адсорбцию ферментов.

3. Ферменты, адсорбированные мелом, легко элюируются водой, и активность ферментов после этого та же, что и в культуральной жидкости, из которой производилась адсорбция.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 20.VII.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Броцкая С. Термофильные протеолитические бактерии. Микробиология, т. XIV, стр. 45, 1945.
2. Имшенецкий А. Микробиологические процессы при высоких температурах, М.—Л., 1944.
3. Имшенецкий А., Солнцева Л. и Кузюрина Л. Термофильные амилолитические бактерии. Микробиология, т. XI, стр. 29, 1942.
4. Крисс А. и Диденко С. Меловые адсорбаты бактериофагов, как терапевтические препараты. Бюлл. экспер. биол. и мед., № 10—11, 1944.

5. Опарин А. и Яльцев П. Применение така-диастаза в текстильной промышленности. Изв. текст. пром. и торг., № 3, стр. 81, 1930.
6. Попова Е. Получение препарата пектиназы из Botrytis cinerea для осветления плодовых соков. Микробиология, т. IV, стр. 247, 1935.
7. Сербинова Н. Осветление плодо-ягодных соков энзимами. М.— Л., 1939.
8. Фениксова Р. и Сегаль Р. Применение Aspergillus oryzae для осахаривания крахмалистого сырья в спиртовом производстве. Микробиология, т. X, стр. 873, 1939.

ПЛЕСНЕВЕНИЕ КИНОФИЛЬМОВ

Б. С. Алеев, К. Ф. Еременко, И. М. Фридман

На фотослое фильмов, доставляемых в лабораторию реставрации кинофильмов НИКФИ[1], часто встречаются мелкие пятна, похожие на колонии плесеней. Неоднократно встречаются также, особенно на старых архивных фильмах, участки, фотослой которых разложился и полностью растворяется или сползает при помещении поврежденных фильмов в воду или реставрационные растворы.

Происхождение подобных дефектов неизвестно, между тем, как показало проведенное лабораторией реставрации кинофильмов НИКФИ в 1945/1946 г. исследование ряда крупных кинофотоколлекций, они наносят значительный ущерб фильмофондам архивов и фильмотек.

Нам казалось, что указанные явления могут быть объяснены развитием на фотослое микроорганизмов. Такое предположение подкреплялось литературными указаниями на аналогичный описанным дефектам характер брака фотобумаги, фотопластинок и кинопленки, обусловливаемый развитием микроорганизмов. Однако среди работников кинофотопромышленности господствует мнение, что поражение микроорганизмами желатины фотослоя кинофильмов невозможно ввиду антисептических свойств реактивов, применяемых при фотообработке фильмов, и бактерицидного действия коллоидного серебра, находящегося в фотослое.

Целью настоящей работы являлась проверка высказанного выше предположения.

Методика

Микроскопическое исследование дефектных кинофильмов не дало убедительных доказательств того, что описанные выше пятна действительно обусловлены развитием микроорганизмов. Поэтому мы пытались экспериментально воспроизвести условия, которые могли бы способствовать развитию на кинофильмах микроорганизмов.

Развитие их на фотослое кинофильмов может быть обусловлено увлажнением пленки за счет отпотевания или хранения во влажной атмосфере, при этом наиболее вероятным будет развитие плесеней. Для проверки этого предположения ряд образцов кинофильмов, имевших пятна плесневого типа, был помещен в эксикаторы, на дно которых наливалась вода или насыщенные растворы солей, присутствие которых создавало относительную влажность воздуха в эксикаторе порядка 80—95%. Эксикаторы были установлены в термостате при температуре 20—22°. Кроме дефектных кинофильмов, в отдельные эксикаторы были помещены нормальные образцы, зараженные спорами распространенных плесеней, развивающихся на различных органических материалах, и нормальные образцы кинофильмов, не подвергавшихся заражению. Время от времени образцы из эксикаторов осматривались, развивающиеся на них плесени отвивались и подвергались микроскопическому исследованию.

Обсуждение результатов

На образцах кинофильмов, помещенных во влажную атмосферу, очень быстро началось набухание фотослоя, а через 6—10 дней начал

[1] Научно-исследовательский кинофотоинститут.

развиваться мицелий плесневых грибов. Раньше всего начали развиваться плесневые грибы на дефектных образцах. Через 15—20 суток на мицелии появилось плодоношение и можно было определить, что на фотослое дефектных образцов появились представители Penicillium и Aspergillus.

Через 25 суток началось разложение желатины в зоне распространения мицелия и фильмы приобрели вид описанных выше дефектных фильмов с разложившимся фотослоем. Повидимому, описанная нами порча кинофильмов не связана с определенными специфическими видами плесеней, так как опыты с искусственным заражением новых образцов проявленной пленки показали, что на фотослое могут расти различные виды Penicillium и Aspergillus, а также Alternaria tenuis и Fusarium sp. Развития на фотослое кинофильмов бактерий нами не наблюдалось. Так как все же представляет интерес, какие именно виды плесеней поражают кинофильмы, то нами продолжается работа по подбору коллекции культур плесневых грибов, выделяемых из поврежденных фильмов, и их определение. В настоящее время установлено участие в порче кинофильмов, кроме некоторых видов Penicillium и Aspergillus, также Oidium lactis.

Предохранить кинофильмы от таких дефектов, как разложение желатины фотослоя, обусловленное длительным развитием плесеней, можно соблюдением обычных требований к условиям хранения органических материалов, т. е. низкие температуры и влажность воздуха ниже 70%. Однако мелкие пятна, искажающие изображение, могут появляться на фильмах за счет увлажнения их при перевозках, при которых требовать соблюдения определенного режима не приходится.

Для борьбы с появлением этих дефектов необходима обработка кинофильмов консервантами, длительно сохраняющимися в фотослое и не портящими изображения. Предварительные опыты по подбору таких консервантов дали положительные результаты.

Выводы

1. При хранении кинофильмов в условиях, способствующих увлажнению их фотослоя, на них развиваются различные плесневые грибы, чаще всего виды Penicillium и Aspergillus.

2. Если увлажнение было кратковременным и затем фильмы вновь высохли, развитие плесеней обусловливает появление на кинофильмах пятен, искажающих изображение. Длительное развитие плесеней может вызвать полное разложение желатины фотослоя и уничтожение изображения.

3. Для борьбы с появлением дефектов, обусловленных развитием плесеней, необходимы: хранение кинофильмов в атмосфере, относительная влажность которой не превышает 70%, или обработка кинофильмов подходящими антисептиками.

Микробиологическая лаборатория ин-та им. Плеханова и Лаборатория реставрации кинофильмов Научно-исследовательского кинофотоинститута

Получено 29.VI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Скородумов Л. С. О бактериальных факторах в технологии фотожелатины, Фотокинохимическая промышленность, № 1, 1934.
2. Archey R. B. Photographic emulsion spots of origin. The Photogr. J., January, p. 19, 1931.
3. Smith G. An introduction to industrial mycology. London, 1946.

АЦЕТОНО-ЭТИЛОВОЕ БРОЖЕНИЕ

ЗАВИСИМОСТЬ ВЫХОДОВ АЦЕТОНА И ЭТИЛОВОГО СПИРТА ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРОВ В СРЕДЕ

Г. А. Ярмола

В последнее время в микробиологии широко разрабатываются вопросы зависимости биохимической деятельности микроорганизмов от изменения условий их жизнедеятельности.

В большинстве случаев изучение условий культивирования сводится к опытам, в которых искусственно создаются те или иные условия путем изменения состава среды. При этом выясняются влияние концентрации различных ингредиентов среды, влияние на данный процесс характера используемых веществ, как например, степень их окисленности или восстановленности. Устанавливается влияние на жизнедеятельность и биохимическую активность физико-химических условий, как активной кислотности, окислительно-восстановительных условий и т. д. При этом чаще всего по отношению к бродильным организмам принимается произвольно стабильность характера осуществляемого ими в данных условиях брожения, о чем судят по продуктам, полученным в результате жизнедеятельности в конце процесса.

Однако сейчас имеются данные, показывающие, что характер брожения может резко изменяться во времени. Известно, что, согласно современной схеме Мейергофа, при спиртовом брожении на первых этапах получаются иные продукты, чем в конце процесса. Еще более резко это наблюдается при развитии во времени ацетоно-бутилового брожения на белковых средах. Процесс этот, как показал Шапошников, проходит в две фазы, резко различные по характеру продуктов брожения. В первой фазе образуются относительно более окисленные продукты (масляная и уксусная кислоты), тогда как во второй фазе — более восстановленные (бутиловый спирт и ацетон).

Двухфазность процесса устанавливается Шапошниковым и в ацетоно-этиловом брожении, которое характеризуется, согласно литературным данным, тем, что накопление основных продуктов в нем подвержено значительным колебаниям; это иногда зависит от характера сбраживаемых веществ.

Так, Aerzberger, Peterson и Fred [8] приводят данные по сбраживанию ацетоно-этиловыми бактериями углеродосодержащих веществ различной степени окисленности. При этом количества ацетона и этилового спирта были различны в зависимости от применяемых веществ. Например, на мальтозе получилось ацетона 6—7%, спирта 23—24% (от сброженного сахара); на раффиназе — ацетона 8—10% и спирта 22—23%; лактат кальция совсем не сбраживался; на крахмале было 8—10% ацетона и 20—24% спирта; глицерин сбраживался с выходами 40—43% спирта без всякого образования ацетона. Baconyi [9] считал, что уксусная кислота (в виде кальциевых солей) сбраживается целиком в ацетон. Из работы Козловой [2] видно, что уксусная кислота сбраживается только в случае присутствия углеводов в среде. Имеются указания Бакони о том, что количества ацетона и спирта могут колебаться в зависимости от концентрации одной и той же среды — кукурузного затора.

Колебания количества ацетона и этилового спирта в зависимости от концентрации углеводов могут найти себе объяснение, с точки зрения двухфазности процесса, в согласии со взглядами, развитыми в 1939 г. Шапошниковым по данному вопросу. На основании ряда работ, проведенных в его лаборатории, он пришел к выводу, что в первую фазу брожения, осуществляемого на естественных средах, происходит преимущественно образование этилового спирта, уксусной и муравьиной кислот. В результате накопления кислот и некоторого сдвига pH в кислую сторону создаются условия, благоприятствующие альдольной конденсации, которая признается необходимой для образования ацетона. В силу этого, при достаточном подкислении субстрата, вместо уксусной кислоты, параллельно спирту начинается образование ацетона. Если эта точка зрения правильна, то можно ожидать, что чем меньше концентрация затора, тем больший удельный вес в общем балансе продуктов брожения имеет первая фаза и наоборот. Для выяснения этого вопроса нами были поставлены опыты с различными углеводами в разных концентрациях. Для приготовления сред в опытах с сахарами применялся картофельный экстракт в качестве источника витаминов и азота в количестве 30 объемных процентов. Каждый опыт сопровождался контролем с одним картофельным экстрактом, который содержал сахара не более 0,25%. Практически на таком контроле брожение почти не шло. Газовыделение не превышало 2,5 г/л, содержание ацетона было не выше 0,24 г/л и спирта — не выше 1 г/л. Соотношение спирта к ацетону было 4 : 1. Таким образом, картофельный экстракт был почти целиком лишен сахара, но содержал все необходимые вещества для роста бактерий. Подвергались сбраживанию ацетоно-этиловыми бактериями следующие вещества: картофель, крахмал, глюкоза, мальтоза. Картофельные среды содержали 0,7; 1,4; 2,5% углеводов по сахару. Отношение спирта к ацетону при брожении на этих средах колебалось: 3,9 : 1 при 0,7 сахара, 2,9 : 1 при 1,4% сахара и 2,1 : 1 при 2,5% сахара.

Количество ацетона увеличивалось с увеличением концентрации картофеля от 0,49 г/л до 2.44 г/л, количество спирта тоже увеличивалось от 1,4 г/л до 5,5 г/л. В опытах с крахмалом ацетон добавлялся в следующих концентрациях: 0,7; 1,4; 2,8% (табл. 1).

Таблица 1

Содержание крахмала в %	Газовыделение в г/л	Ацетон		Спирт		Соотношение спирт / ацетон
		в г/л	в % к сброженному сахару	в г/л	в % к сброженному сахару	
2,8	28 8	2,19	8,0	5,2	18,6	2,3 : 1
1,4	12 0	0.99	7,0	3,1	21,4	3 : 1
0,7	6,4	0,42	6,0	1,9	23	4 : 1

Приведенная таблица показывает, что с уменьшением концентрации крахмала понижается количество ацетона в абсолютных цифрах и в процентах по отношению к сброженному сахару. Уменьшение абсолютного количества спирта тоже довольно велико; процентное же содержание спирта в отношении к сброженному сахару увеличивается. Соотношение спирта к ацетону сдвигается в сторону спирта от 2,3 : 1 до 4 : 1 при содержании крахмала от 2,8 до 0,7%. То же самое получается при

сбраживании мальтозы, если ее взять в концентрациях 2; 1; 0,5%. Результаты этого опыта можно видеть на рис. 1, который показывает плавное увеличение количества ацетона и этилового спирта вместе с увеличением концентрации мальтозы. Отношение спирта к ацетону тоже меняется от 2,1 : 1 при содержании мальтозы в 2% до 12 : 1 при ее содержании в 0,5%.

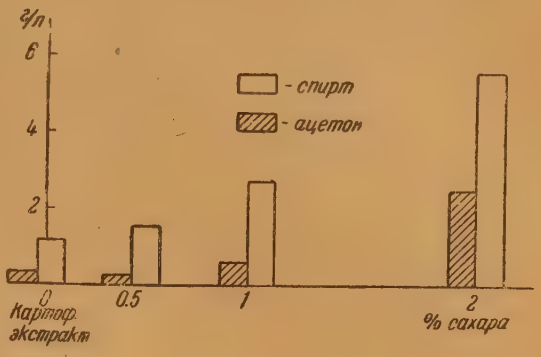


Рис. 1

Опыты с глюкозой показали ту же закономерность, это можно видеть на рис. 2.

Увеличение количества ацетона с увеличением концентрации глюкозы идет более резко, чем увеличение количества спирта. Соотношение спирта к ацетону меняется от 1,6 : 1 при концентрации глюкозы в 5% до 1,4 : 1 при ее содержании в 2,5% и, наконец, до 4 : 1 при ее содержании в 1%.

На основании всех вышеприведенных опытов с различными источниками углерода можно сказать, что различные вещества сбраживаются ацетоно-этиловыми бактериями поразному. Образование сольвентов и их соотношения при этом получаются разные, последние могут варьировать от 2,2 : 1 до 1,4 : 1 при концентрациях углеводов от 2 до 3%.

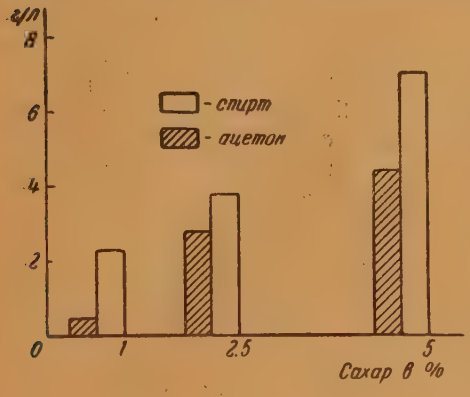


Рис. 2

Эти данные показывают также, что в пределах концентрации углеводов до 2,5—3% образование спирта происходит равномерно и представляет собой при графическом изображении прямую линию. Что же касается ацетона, то его накопление в субстрате сначала очень ничтожно (до 0,5% содержания углеводов в субстрате). В дальнейшем накопление ацетона несколько возрастает и только при содержании углеводов около 2% достигает почти той же интенсивности (скорости), что и образование спирта.

Приведенные опыты показывают так же, как и литературные данные, относительно легкую смещаемость накопления основных продуктов (спирта и ацетона) в ацетоно-этиловом брожении. Это соотношение резко меняется при изменении концентрации источников углерода от 0 до 2—2,5%. При этом обнаруживается определенная закономерность, заключающаяся в том, что при малом (до 1%) содержании углеводов в субстрате образование ацетона сильно отстает от образования спирта. Отношение спирта к ацетону колеблется от 4 : 1 до 12 : 1. При большем содержании углеводов это соотношение меняется, приближаясь к величинам 2 : 1 и 1,6 : 1, за счет значительного повышения скорости образования ацетона. Скорость образования спирта остается почти одинаковой.

Таким образом, на основании вышеприведенных опытов можно сказать, что нормальный процесс ацетоно-этилового брожения может от-

клоняться от нормы как в зависимости от концентрации бродильного материала, так и от природы сбраживаемых веществ. С точки зрения Шапошникова, ацетоно-этиловое брожение идет в две фазы. На основании работ Зайцева [1] он считает, что первая фаза, повидимому, характеризуется преимущественным и параллельным образованием этилового спирта и уксусной кислоты. Во вторую фазу вместо уксусной кислоты образуется ацетон. Параллельно с уксусной кислотой и спиртом идет также образование муравьиной кислоты, которая, повидимому, является результатом десмолиза второго порядка, который приводит к образованию двухчленной цепи ацетальдегида из триоз. Переход первой фазы брожения во вторую определяется активной кислотностью среды — сдвигом ее в кислую сторону, зависящим от накопления уксусной и муравьиной кислот.

Так как ацетоно-этиловое брожение представляет собой вполне аноксидативный процесс, то оно должно рассматриваться как результат равновесной реакции сопряженного окисления и восстановления, осложненного в известной мере реакциями десмолиза и конденсации. С этой точки зрения образование параллельно основному продукту брожения — этиловому спирту — уксусной кислоты или ацетона должно быть поставлено в связь с зависимостью альдольной конденсации от реакции среды. Ацетон в настоящее время рассматривается как продукт альдольной конденсации двух молекул уксусного альдегида, с последующим отщеплением одного атома углерода. Поэтому увеличение интенсивности образования ацетона при подкислении субстрата можно рассматривать как стимуляцию реакции конденсации в кислой среде. Хотя прямых данных в этом отношении пока нет, но, повидимому, это положение можно обосновать данными по отношению к ацетоно-бутиловому брожению (Шен [6, 7], Шапошников [5], Мантейфель [3, 4] и др.). Переход во вторую фазу ацетоно-бутилового брожения связан с накоплением масляной, уксусной и других кислот, в случае их нейтрализации мелом брожение не переходит во вторую фазу (Шен, Мантейфель).

Согласно этим взглядам, соотношение ацетона и этилового спирта в изучаемом брожении должно зависеть от соотношения времени и полноты прохождения первой и второй фаз брожения. Поэтому, чем больший удельный вес в процессе имеет первая фаза, тем большее значение получает соотношение спирта и ацетона, образующихся в процессе, и, наоборот, чем большее значение приобретает вторая фаза, тем это отношение становится меньше. Это подтверждается вышеизложенными данными: при малом содержании углеводов процесс останавливается на первой фазе, и только при некотором избытке их происходит переход во вторую фазу. Однако, поскольку переход во вторую фазу, согласно изложенной теории, зависит от кислотности среды, а брожение проводится в присутствии мела, то сдвиг кислотности будет зависеть как от скорости образования кислот, так и от скорости их взаимодействия с мелом.

В заключение приношу глубокую благодарность профессору В. Н. Шапошникову за руководство работой.

Выводы

1. Изучение ацетоно-этилового брожения на различных концентрациях сбраживаемых углеводов подтверждает правильность деления процесса на две фазы.

2. При концентрации углеводов в субстрате, не превышающей 1%, образование спирта во много раз больше, чем образование ацетона.

3. При более высоких концентрациях сбраживаемых углеводов образование ацетона значительно повышается и отношение спирта к ацетону снижается до 2,3 : 1.

4. Это снижение отношения $\frac{\text{спирт}}{\text{ацетон}}$ объясняется тем, что во вторую фазу брожения значительно повышается энергия образования ацетона, тогда как образование спирта остается приблизительно таким же, как и в первую фазу.

5. Таким образом, отношение спирта к ацетону может прежде всего определяться относительным масштабом развития первой и второй фаз брожения.

Лаборатория микробиологии
Московского государственного
университета

Получено 18.VI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев А. Н. Значение активной кислотности среды для ацетоно-этилового брожения. Микробиология, т. VIII, стр. 582, 1939.
2. Козлова Е. И. Переработка уксусной кислоты в ацетоно-этиловом брожении в зависимости от наличия сахара в субстрате. Микробиология, т. IX, вып. 4, 1940.
3. Мантейфель А. Я. Спорообразование у бактерий. II. Выяснение условий спорообразования у ацетоно-бутиловых бактерий, Микробиология, т. IX, стр. 89, 1940.
4. Мантейфель А. Я. Автолиз у ацетоно-бутиловых бактерий. Микробиология, т. X, стр. 273, 1941.
5. Шапошников В. Н. Химизм ацетоно-этилового брожения в свете новых данных. Микробиология, т. IX, стр. 344, 1940.
6. Шен М. Ацетоно-бутиловые бактерии. Успехи биологической химии, т. 5, 1927.
7. Шен М. Реакция среды и ее роль в явлениях брожения. Успехи биологической химии, т. 5, 1927.
8. Aerzberger C. F., Peterson W. H. and Fred E. B. Certain factors that influence acetone production by Bac. acetoethylicum, J. Biol. Chem., v. 44, p. 465, 1920.
9. Baconyi S. Versuche z. Theorie der Aceton-Aethyl Alcohol Gärung. Biochem. Z., Bd. 169, S. 125, 1926.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЩНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СЛОЯ ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ НЕКОТОРЫХ ОЗЕР

В. А. Экзерцев

Иловые отложения в значительной мере отражают характер самого водоема. В озерах евтрофного типа, где велика первичная продукция за счет развития фитопланктона и высшей прибрежной растительности, там и иловые отложения зачастую до 50% от сухого веса состоят из органических веществ.

Некоторые растительные и животные остатки, как пыльца древесной растительности и остатки зоонаселения, в виде челюстей личинок хирономид и т. п., сохраняются очень хорошо и могут вполне характеризовать прежнюю картину водоема.

Но значительная часть органических остатков, попадающая на дно водоема, разлагается. Распад органического вещества илов идет в основном за счет деятельности микроорганизмов только лишь в верхних слоях, в глубинных же слоях донных отложений дальнейшая бактериальная минерализация сильно задерживается.

Изучением микробного населения в иловых отложениях занимались Омелянский [6], Пельш [7], Штурм и Канунникова [10], Хартулари [9], Дианова и Ворошилова [1], Henrici [11], Карзинкин [2], Салимовская-Родина [8] и др.

В настоящей работе по предложению С. И. Кузнецова мы решили уточнить по возможности толщину активного слоя озерных иловых отложений, где еще достаточно интенсивно идут процессы распада органического вещества.

Для решения этого вопроса необходимо было:

1) установить, на какой глубине иловых отложений наблюдается резкое снижение количества микрофлоры;

2) изучить вертикальное распределение в иловых отложениях окислительно-восстановительного потенциала как показателя активности процессов разложения органического вещества.

Методика

Вертикальное распределение микроорганизмов учитывалось: методом микроскопического счета, путем учета сапрофитов на твердых питательных средах, методом обрастания предметного стекла. Окислительно-восстановительный потенциал определялся электрометрически по различным горизонтам в вертикальном разрезе с помощью потенциометра Стрелкова. Образцы илов анализировались весной, летом и зимой. Для взятия иловых проб мы применяли поршневой бур Сукачева. Взятая этим буром проба ила немедленно переводилась в стерильную стеклянную трубочку, которая тщательно закупоривалась с обеих сторон стерильными резиновыми пробками. В таком виде проба поступала в лабораторию для анализа. Поверхностные илы, обладающие жидкой консистенцией, брались батометром Руттнера. Анализировались пробы в день их взятия по прошествии нескольких часов после отбора. Микроскопический учет бактериального населения иловых отложений прово-

дился по упрощенной методике Германова. В частности отсутствовало промывание ила раствором 2 *N* NaCl, так как илы не содержали заметных количеств солей кальция. Аэробы выращивались на МПА и на среде Чапека без мела. Анаэробные микроорганизмы культивировались на обычном МПА в чашках Петри. При этом чашки помещались в вакуум-эксикатор, из которого выкачивался воздух, затем он заполнялся водородом. Длительность инкубации 7 суток при 30°. Спороносные виды бактерий выращивались также на МПА. Перед посевом навеска ила в 1 г вносилась в пробирку с 10 см³ стерильной воды и нагревалась на водяной бане при 80° в течение 15 минут, после чего делались соответствующие разведения и посев.

Активность бактериальной флоры в верхних слоях иловых отложений изучалась методом пластинок обрастания. С этой целью к деревянному стержню прикреплялись каучуковые пробки на расстоянии 10 см одна от другой. В специальные надрезы на пробках вставлялись предметные стекла: по два стекла в каждую пробку. Установка погружалась в ил так, что нижнее стекло находилось на глубине не свыше 60 см от поверхности ила, причем верхнее стекло занимало такое положение, при котором поверхность раздела ила и воды всегда проходила посередине стекла. Экспозиция продолжалась 5 суток. При снятии опыта предметные стекла подсушивались, фиксировались 96% спиртом и красились эритрозином. На каждом стекле под микроскопом просчитывалось 50 полей зрения.

Для измерения окислительно-восстановительного потенциала илов применялись гладкие платиновые электроды (Кузнецов [4]).

Ил непосредственно из бура набирался в стеклянную трубку-приемник и плотно закрывался с двух сторон каучуковыми пробками, через одну из которых проходил электрод, а через другую стеклянная трубочка, служившая контактом с ванночкой, в которой находился раствор KCl.

Наполнение приемника илом производилось с соблюдением всех предосторожностей, исключающих возможность попадания пузырьков воздуха, который мог бы исказить действительную картину окислительно-восстановительных условий анализируемого образца. Наблюдения велись на озерах Бисерово, Коломенское и Пиявочное.

Микробиологическая характеристика иловых отложений

К решению поставленной задачи мы подошли путем учета общего количества бактериальной флоры микроскопическим методом, так как эта величина может характеризовать общую населенность иловых отложений микроорганизмами.

Интенсивность распада органического вещества илов в значительной мере связана с развитием сапрофитных форм, а поэтому учет последних был нами выбран как индикатор на процессы распада легко разрушаемых органических веществ, в основном белкового характера. Метод обрастания предметного стекла бактериями был выбран для характеристики активности микрофлоры в иловых отложениях.

Общее количество бактерий учитывалось по трем озерам. Результаты сведены в табл. 1.

Нетрудно заметить, что количество бактерий в поверхностном слое иловых отложений достигает 1,3 млрд. на 1 г сырого ила и 42 млрд. на 1 г сухого ила. Основная масса их находится в верхних слоях, глубинные же слои хотя и содержат бактерий, но число их здесь резко снижается. Эта закономерность наблюдается по всем трем водоемам. Количество бактерий в илу, повидимому, находится в прямой зависимости от сезонной смены явлений. В этом можно убедиться хотя бы на при-

Таблица 1

Вертикальное распределение бактерий по данным микроскопического учета

Глубина горизонта в см	В миллионах на 1 г сырого ила						В миллиардах на 1 г сухого ила					
	оз. Коломенское		оз. Пиявочное		оз. Бисерово		оз. Коломенское		оз. Пиявочное		оз. Бисерово	
	2/VI 1946, Лука	3/VIII 1946, Плес	5/VI 1946	1/VIII 1946	6/IX 1946	31/I 1947	2/VI 1946, Лука	3/VIII 1946, Плес	5/VI 1946	1/VIII 1946	6/IX 1946	31/I 1947
Поверхностный ил	1 300	566	515	—	740	530	30,2	13,2	42,9	—	19,5	13,9
10	935	425	487	425	603	402	16,1	7,34	41,3	23,6	15,5	10,3
30	798	415	393	397	534	347	12,7	6,59	19,6	19,8	13,3	8,7
60	—	402	—	279	402	320	—	6,36	—	13,3	9,34	7,44
100	290	310	—	256	347	283	3,87	4,14	—	10,2	5,68	4,64
150	—	—	363	201	—	—	—	—	14,5	8,19	—	—
200	221	261	—	—	347	—	2,87	3,43	—	—	—	—
250	—	—	277	187	—	—	—	—	8,65	5,84	—	—
300	196	229	—	—	283	—	2,52	2,94	—	—	—	—
400	205	192	230	164	228	—	1,63	1,52	6,97	4,96	—	—
500	187	156	—	—	192	—	—	—	—	—	—	—
600	—	—	—	133	—	—	—	—	—	2,11	—	—

мере оз. Бисерова. Так, количество микроорганизмов здесь на 1 г сырого ила в поверхностном горизонте в сентябре было 740 млн., а в январе 530 млн.

Одновременно на МПА учитывалось количество сапрофитов. Результаты анализов вертикального распределения сапрофитов по данным учета на чашках с МПА приводятся в таблицах 2, 3 и 4.

Таблица 2

Оз. Коломенское

Глубина горизонта в см	Количество сапрофитов в тыс. на 1 г сырого ила				
	аэробных по анализу от 2/VI 1946	аэробных по анализу от 3/VIII 1946	по анализу от 21/III 1947		
			аэробных	анаэробных	спороносных
Поверхностный ил	100	16	15	2,7	3,0
10	60	8,0	—	—	—
30	12	7,0	5,0	2,5	5,0
60	—	4,0	4,0	1,2	6,0
100	2,0	0,07	3,0	0,0	4,0
200	0,3	0,06	1,0	0,0	0,9
300	0,6	0,05	0,4	0,0	0,2
400	0,8	0,04	0,04	0,0	0,05
500	—	0,01	0,03	0,0	0,04

Как видно из таблиц, наибольшее количество бактерий находится в верхних слоях иловых отложений. Резкое снижение количества микроорганизмов начинается с 30—60 см глубины от поверхности ила. В абсолютных величинах аэробных видов отмечается во много раз больше по сравнению с анаэробными видами, причем как те, так и дру-

Таблица 3

Оз. Пиявочное

Глубина горизонта в см	Количество сапрофитов в тысячах на 1 г сырого ила				
	аэробных по анализу от 5/VI 1946	аэробных по анализу от 1/VIII 1946	по анализу от 23/III 1947		
			аэробных	анаэробных	спороносных
Поверхностный ил	220	35	20	2,8	3,0
10	50	14	17	1,4	7,0
30	10	8,0	7,0	2,6	5,0
60	—	1,2	5,0	1,6	3,0
100	—	0,5	1,5	0,5	0,9
150	0,6	0,3	1,2	0,3	0,5
200	—	—	0,7	0,0	0,2
250	0,2	0,27	0,2	0,0	0,2
400	—	0,15	0,3	0,5	0,3
500	—	—	0,1	0,12	0,13
600	—	0,3	—	0,03	0,1

Таблица 4

Оз. Бисерово

Глубина горизонта в см	Количество сапрофитов в тысячах на 1 г сырого ила				
	аэробных на среде Чапека по анализу от 6/IX 1946	аэробных на МПА без глюкозы по анализу от 6/IX 1946	по анализу от 31/I 1947		
			аэробных	анаэробных	спороносных
Поверхностный ил	90	15	42	1,9	1,6
10	35	10	12	1,2	1,8
30	28	5	7	0,8	3,3
60	23	5	7	0,8	1,9
100	5,3	4	5	0,5	1,7
200	1,4	1,2	—	—	—
300	0,28	1,1	—	—	—
400	0,20	0,51	—	—	—
500	0,14	0,22	—	—	—

гие уменьшаются численно по мере увеличения глубины залегания ила. Спороносные виды ведут себя по-иному: они, наоборот, имеют тенденцию к повышению до глубины примерно в 60 см, а уже с этой глубины количество их резко уменьшается.

Опыты по изучению активности бактериальной флоры с помощью метода пластинок обрастания проводились на оз. Пиявочном и представлены на рисунке, из которого видно, что нитчатые железобактерии обрастают предметное стекло исключительно в той его части, где оно погружено в воду. Siderocapsa идет дальше в глубь ила до 1,7 см от его поверхности. Толстые нити, которые, повидимому, соответствуют синезеленым водорослям рода Phormidium или Lyngbya, в основной своей массе располагаются над поверхностью ила.

Тонкие нити, соответствующие гифам грибов, наиболее интенсивно обрастают стекло на глубине от 1,5 до 3 см от поверхности ила,— там, где кончаются живые клетки водорослей. Бактериальные организмы

(палочки и кокки) распределяются более равномерно, хотя основной максимум обрастания стекла они дают в придонном слое воды. Глубже 3—3,5 см от поверхности ила встречаются лишь единичные бактериальные формы. Стекла, погруженные на глубину 60 см, остаются уже совершенно чистыми.

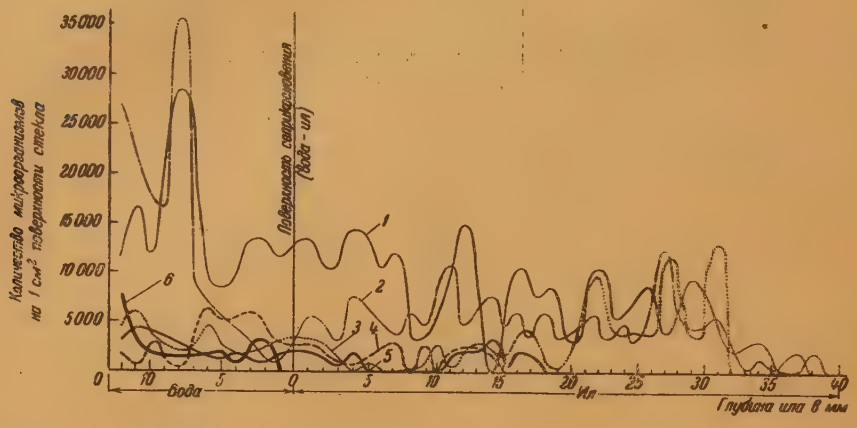


Рис. 1. Обрастание предметного стекла микрофлорой в Пиявочном озере. Срок экспозиции с 31 июля по 3 августа 1946 г. *1* — палочки; *2* — кокки; *3* — тонкие нити; *4* — толстые нити; *5* — Siderocapsa; *6* — нитчатые железобактерии

Окислительно-восстановительный потенциал иловых отложений

Окислительно-восстановительный потенциал применяют в лимнологической практике для характеристики того напряжения, с которым протекают биологические процессы в водоемах (Карзинкин и Кузнецов [3], Кузнецов [4, 5]), однако все определения сводились лишь к поверхностному слою ила.

В результате проведенных анализов образцов иловых отложений мы получили материал, характеризующий окислительно-восстановительные условия илов исследуемых озер до глубины 5—6 м от поверхности ила. Данные сведены в табл. 5.

Как видно из табл. 5, активная кислотность илов для различных озер неодинакова. Так, по дистрофному Пиявочному озеру в поверхностном слое ила отмечены ее минимальные значения: pH по анализу от 5/VI 1946 г. здесь было равно 6,0. По мезотрофному Коломенскому озеру pH для такого же слоя 2/VI 1946 г. было 7,2. В вертикальном разрезе картина такова: вначале активная кислотность постепенно снижается, а затем на больших глубинах она вновь начинает повышаться, достигая вблизи от коренного дна нейтрального пункта. Концентрация водородных ионов в иловых отложениях изменяется в зависимости от времени года.

Окислительно-восстановительный потенциал, выраженный в единицах rH, в верхних горизонтах ила значительно колеблется. Например, в оз. Коломенском rH по анализу от 2/VI 1946 г. в поверхностном слое был 13,4, на глубине 10 см он снизился до 11,1, а в слое на глубине 30 см он снова повысился до величины 12,5. Эти колебания окислительно-восстановительного потенциала в поверхностных слоях наблюдаются и по двум другим водоемам. Они в значительной степени зависят от времени года. На больших глубинах, свыше 1 м, величины rH остаются более постоянными, что указывает на замирание биологических процессов в этих слоях.

Таблица 5

Окислительно-восстановительный потенциал иловых отложений

Глубина горизонта в см	Оз. Коломенское				Оз. Пиявочное						Оз. Бисерово	
	2/VI 1946, Лука		3/VIII 1946, Плес		5/VI 1946		1/VIII 1946		23/III 1947		31/I 1947	
	pH	rH	pH	rH	pH	rH	pH	rH	pH	rH	pH	rH
Поверхностный ил	7,2	13,4	6,7	11,9	6,0	18,5	6,8	14,7	6,12	12,9	6,1	8,5
10	7,3	11,1	6,5	12,7	6,1	12,3	6,5	14,3	6,43	11,4	6,6	11,0
30	6,9	12,5	6,5	14,3	6,45	12,8	6,8	14,3	6,52	14,2	6,54	8,3
60	—	—	6,3	13,9	—	—	6,7	14,2	6,43	15,4	6,75	12,2
100	6,8	12,5	6,2	13,3	—	—	6,5	13,9	6,52	16,1	7,14	12,6
150	—	—	—	—	6,42	13,3	6,4	11,3	—	—	—	—
200	6,8	13,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
250	—	—	—	—	6,71	15,4	6,5	11,1	6,6	16,6	—	—
300	6,7	12,9	6,3	13,3	—	—	—	—	—	—	—	—
400	6,7	12,9	—	—	6,57	14,6	6,5	13,1	6,77	14,2	—	—
500	—	—	—	—	—	—	7,5	13,3	—	—	—	—
600	—	—	—	—	—	—	7,6	12,8	—	—	—	—

Обсуждение результатов

Сопоставление приведенных выше анализов дает нам право сделать некоторые обобщения.

В оз. Бисерове граница биологически активного слоя ила проходит близко к 100 см. В этом можно убедиться по сопоставлению данных сентябрьских и январских анализов.

В оз. Коломенском граница микробиологически активного слоя проходит на глубине 60 см от поверхностного слоя ила. Это подтверждается результатами учета сапрофитов, которые в данном случае могут быть использованы в качестве показательных организмов.

В оз. Пиявочном граница затухания билогических процессов проходит на глубине 30 см от поверхностного слоя ила. Этому положению соответствуют как данные микроскопического учета бактериальных организмов, так и данные учета аэробных и анаэробных сапрофитов на чашках с МПА (таблицы 1 и 3).

Анализ активности микроорганизмов при помощи метода пластинок обрастания показал, что мощность слоя ила, в котором еще достаточно много активных форм, невелика. Она, по данным наших опытов, не превышает 3,5 см. На этой глубине обрастание стекла за пятисуточный срок экспозиции происходило единичными бактериальными формами. В слоях ила, лежащих ниже 3,5 см от поверхности его, обрастание стекла за указанный срок экспозиции практически уже не происходит.

Таким образом, сопоставление наших экспериментальных данных с данными Омелянского, Кузнецова и Пельша позволяет нам сделать вывод, что для озер с весьма различной трофией толщина микробиологически активного слоя во всяком случае не превышает 1 м. Так, по евтрофным озерам (Бисерово, Черное и Белое) граница затухания микробиологических процессов лежит на глубине около 1 м от поверхностного ила. По мезотрофному Коломенскому озеру толщина активного слоя ила сокращается до 60 см. В дистрофном Пиявочном озере этот слой имеет толщину около 30 см, а в олиготрофном Габозере он не превышает 20 см.

Метод посева бактерий на твердые питательные среды показывает, что в глубже лежащих слоях ила ниже этой границы встречаются только отдельные жизнедеятельные виды. Однако метод микроскопического учета дает еще громадное количество бактерий значительно ниже этого активного слоя, выражающееся сотнями миллионов на 1 г сырого ила или же миллиардами на 1 г сухого ила. Но остается еще невыясненным, в каком состоянии жизнедеятельности находятся эти микроорганизмы. Данные по стабильности химического состава органического вещества иловых отложений заставляют предполагать, что эти микроорганизмы находятся в состоянии, близком к анабиозу. Этот вопрос не решен и является задачей ближайших исследований.

Выводы

1. Метод микроскопического учета бактериального населения иловых отложений показывает, что общее количество микроорганизмов в поверхностных слоях приближается к одному миллиарду на 1 г сырого ила. Резкое снижение количества микрофлоры происходит на глубине около 1 м.

2. Метод учета микроорганизмов на твердых питательных средах показывает, что поверхностные слои ила содержат сотни тысяч бактериальных клеток на 1 г сырого ила. Резкое снижение количества микрофлоры наблюдается на глубине 30—60 см от поверхности ила.

3. Вертикальное распределение анаэробных форм бактерий вполне соответствует таковому для аэробных сапрофитов, отличаясь только по абсолютным величинам: по количеству клеток на 1 г или анаэробов значительно меньше, чем аэробов.

4. Метод обрастания предметного стекла показывает, что обрастание при пятисуточной экспозиции по Пиявочному озеру происходит только в поверхностных слоях ила до глубины 3,5 см.

5. Наиболее низкие значения окислительно-восстановительного потенциала наблюдаются в поверхностных слоях иловых отложений. Окислительно-восстановительный потенциал, выраженный в единицах rH, как правило, сначала понижается, а затем с некоторой глубины вновь повышается. Окислительно-восстановительные условия, при которых протекают процессы разложения органического вещества ила, в различных озерах неодинаковы.

6. По данным наших анализов, толщина микробиологически активного слоя иловых отложений может быть принята: для оз. Бисерова около 100 см, для оз. Коломенского — 60 см и для оз. Пиявочного — 30 см.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 14.VI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Дианова Е. и Ворошилова А. Бактериальный профиль морских и озерных осадков как показатель их эрозии и возраста. ДАН СССР, т. XXX (3), стр. 274, 1941.
2. Карзинкин Г. С. К изучению бактериального перифитона. Тр. лимнологической станции в Косине, т. 17, стр. 21, 1934.
3. Карзинкин Г. С. и Кузнецов С. И. Новые методы в лимнологии. Тр. лимнологической станции в Косине, т. 13—14, стр. 47, 1931.
4. Кузнецов С. И. Окислительно-восстановительный потенциал в биологии. Успехи биологической химии, т. 10, стр. 119, 1933.
5. Кузнецов С. И. Окислительно-восстановительный потенциал в озерах и метод его колориметрического определения. Тр. лимнологической станции в Косине, т. 20, стр. 55, 1935.

6. Омелянский В. Л. Заметки о сапропеле. Известия Сапропелевого комитета, т. 2, стр. 11, 1925.
7. Пельш А. Д. О неоднородности жидкой фазы ила (гидрохимическая роль микроорганизмов). Ученые записки Ленингр. гос. университета № 30, Серия биологических наук, вып. 8, стр. 5, 1939.
8. Салимовская-Родина А. Г. Опыт применения метода пластинок обрастания к изучению бактериальной флоры воды. Микробиология, т. V, стр. 487, 1936.
9. Хартулари Е. М. Бактериологические и химические исследования ряда подмосковных озер в связи с вопросом разложения ила с образованием газов. Тр. лимнологической станции в Косине, т. 22, стр. 115, 1939.
10. Штурм Л. Д. и Канунникова З. А. Распределение микроорганизмов в пресноводных иловых отложениях. Микробиология, т. XIV (4), стр. 260, 1945.
11. Henrici A. Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. J. Bact., v. 25, p. 277, 1933.

КАПЕЛЬНЫЙ ДИАЛИЗ — МЕТОД ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А. Е. Крисс, В. И. Бирюзова и А. М. Золковер

Необходимым условием для электронномикроскопических исследований биологических объектов является очистка их от примесей — компонентов среды, продуктов клеточного обмена и распада, так как при высушивании препаратов эти примеси маскируют самый объект.

Одним из распространенных способов очистки микробиологических препаратов для целей электронной микроскопии служит метод промывки их дестиллированной водой путем центрифугирования, примененный в ряде немецких и американских работ.

Этот метод не лишен недостатков. Процесс центрифигурования может вызвать различные морфологические и цитологические изменения объектов: повреждение жгутикового аппарата у бактерий, распад цепочек клеток, нарушения в плазме, искусственное разобщение отдельных клеточных элементов при начинающемся лизисе и т. п.

В работах американских авторов (Mudd и др. [2]) рекомендуется так называемый менисковый способ очистки. Объект в капле среды помещается на сеточку, покрытую коллодионной пленкой — «предметное стекло» для электронной микроскопии. Через короткое время сеточка захватывается пинцетом за край и прикасается каплей к наклоненному мениску дестиллированной воды в пробирке. При этом капля среды стягивается поверхностным натяжением воды, а объект остается на пленке.

При оценке этого метода необходимо учесть, что здесь экспериментатор сталкивается с условиями, которые носят в значительной мере случайный характер. Бóльшая часть бактерий отмывается мениском вместе со средой. Нет уверенности также в сохранении нормальной конфигурации клеток.

Недостатки описанных методов побудили заняться разработкой простого метода, который позволил бы проводить очистку объекта без каких-либо нарушений в нем и вместе с тем благоприятствовал бы возможности изучения онтогенеза клеток или различных физических и химических воздействий на объект непосредственно на пленке «предметного стекла», по типу «висячей капли» или «агаровой камеры».

Описание метода, разработанного в кабинете электронной микроскопии при Отделении биологических наук Академии Наук СССР и названного методом капельного диализа, составляет содержание настоящей статьи.

Принцип этого метода заключается в применении опорной коллодионной пленки, используемой для приготовления «предметного стекла» в качестве диализирующей перепонки.

Сущность метода капельного диализа состоит в следующем: капля хорошо профильтрованного 2% раствора коллодия или целлулоида в амилацетате наносится на поверхность стерильной дестиллированной воды, налитой в стерильную чашку Петри. Капля растекается по поверхности воды, образуя после испарения амилацетата очень тонкую пленку. На эту пленку осторожно накладываются опорные сеточки.

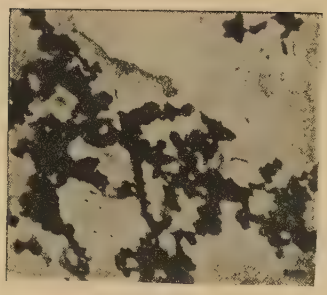


Рис. 1

Рис. 2

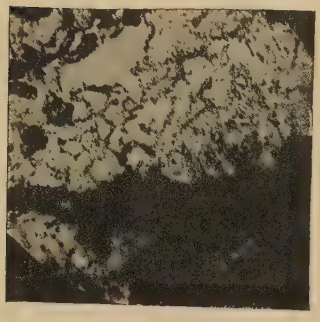


Рис. 3

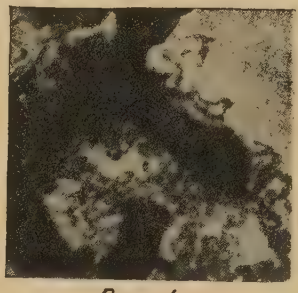


Рис. 4

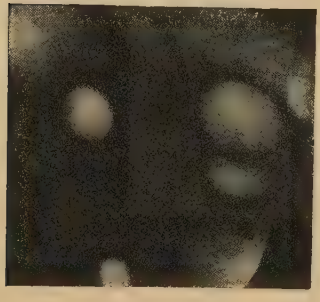


Рис. 5

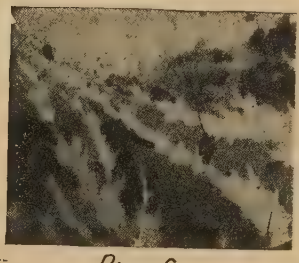


Рис. 6

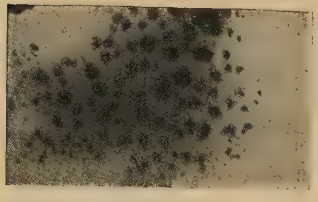


Рис. 7

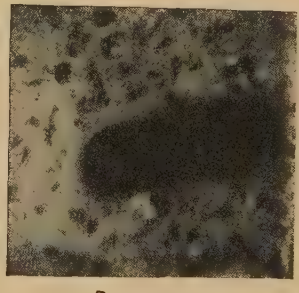


Рис. 8

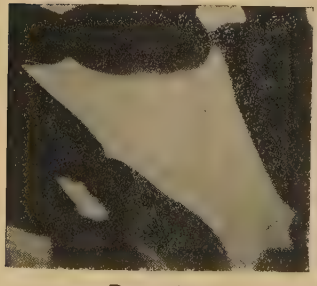


Рис. 9

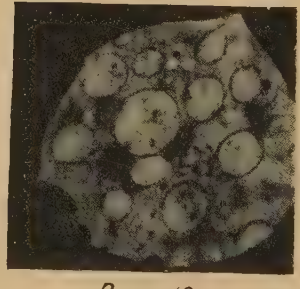


Рис. 10

В местах расположения сеточек наносятся капли с объектом объемом 0,1 мл с таким расчетом, чтобы сеточка оказалась на дне капли и в центре ее. Чашка Петри закрывается и оставляется при температуре 20—25° на определенный срок, в течение которого происходит диализ веществ — примесей, сопровождающих объект.

При необходимости, по условиям опыта, остановки развития организмов в капле через определенный промежуток времени, открытая чашка Петри помещается под стеклянный колпак на 15—20 минут, где происходит фиксация клеток парами подогретого 40% формалина (Исаев, Крисс и Рукина [1]).

После фиксации чашка Петри вновь закрывается и диализ продолжается все остальное время, необходимое для полного вымывания примесей из препарата.

По окончании срока диализа под пленку с каплями объекта и сеточками подводятся металлические петли диаметром 1,0 см, вокруг которых пленка обрывается иглой. Петли развешиваются на цилиндрах пьедестала и подсушиваются. Сетки с объектом извлекаются из петель тонким пинцетом, путем надрыва пленки вокруг сетки, и помещаются в объект — держатель для электронного микроскопа.

Очень важно сохранить стерильные условия при применении метода капельного диализа. Нам приходилось наблюдать развитие микроколоний бактерий на обращенной к воде стороне пленки в местах, где происходил диализ веществ из бульона. Эти микроколонии появлялись в тех случаях, когда дестиллированная вода или чашки Петри были нестерильны.

Следующие опыты характеризуют скорость процессов диализа составных элементов питательных сред, обычно применяемых в микробиологической практике, и некоторых других растворов.

Опорная (диализирующая) пленка готовилась в чашках Петри диаметром 10 см. В чашки наливалось 50 мл дестиллированной воды, и на поверхность ее наносилась капля (0,02 мл) 2% раствора парлодия в амилацетате. Образовавшиеся пленки служили перепонками для диализа МПБ, 10% раствора хлористого натрия, синтетической среды Чапека (состав: H_2O — 1 000 мл; K_2HPO_4 — 0,5 г; $MgSO_4$ — 0,5 г; NaCl — 0,5 г; KNO_3 — 1 г; $FeSO_4$ — следы; сахароза — 20 г), 10% раствора сахарозы и насыщенного спиртового раствора пикриновой кислоты. На пленки, поверх предварительно уложенных сеточек, наносилось по 0,1 мл перечисленных растворов. Диализ проводился при температуре 18—20°.

Препараты просматривались в электронном микроскопе через 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 18, 24 часа от начала диализа. Контролями являлись препараты из тех же растворов, но не подвергавшиеся диализу (рис. 1—10).

Мясопептонный бульон, предварительно профильтрованный в приборе Зейтца, как показали эти опыты, диализуется очень медленно.

Рис. 1. Препарат насыщенного спиртового раствора пикриновой кислоты без диализа. ×7000

Рис. 2. Культура спороносной палочки № 1 в насыщенном спиртовом растворе пикриновой кислоты без диализа. ×7000

Рис. 3. Препарат 10% раствора хлористого натрия без диализа. ×7 000

Рис. 4. Культура спороносной палочки № 1 в 10% растворе хлористого натрия без диализа. ×7000

Рис. 5, 6, 7. Препараты МПБ без диализа. ×7000

Рис. 8. Культура спороносной палочки № 1 в МПБ без диализа. ×7000

Рис. 9. Культура спороносной палочки № 1 в МПБ после диализа. ×7000

Рис. 10. Препарат 10% раствора сахарозы без диализа. ×7000

В первые часы диализа препараты не отличаются от контрольных. После 5—7-часового диализа уже можно видеть участки пленки, свободные от каких-либо веществ, но и 8—9-часовой диализ, и даже диализ, продолжающийся 12 часов, не позволяют получить пленки без отдельных участков, затянутых аморфным налетом с вкрапленными в него мелкими зернами. Диализ веществ бульона обычно заканчивался через 18—24 часа в этих условиях опыта.

10% раствор хлористого натрия диализуется с большей скоростью. После 3—4-часового диализа на пленке еще легко обнаружить крупные кристаллы соли, тогда как в препаратах, приготовленных после 6-часового диализа, лишь изредка встречаются очень мелкие кристаллики NaCl. Обычно 8-часовой диализ оказывался достаточным для полного удаления хлористого натрия из препарата. Соли, являющиеся компонентами среды Чапека, полностью диализовались через 12 часов.

Относительно медленно по сравнению с 10% раствором NaCl диализовался 10% раствор сахарозы. Пленка после 6-часового диализа была еще сплошь затянута налетом неравномерной толщины, и лишь после 12-часового диализа удалось получить чистые препараты.

Насыщенный раствор пикриновой кислоты в 96% спирте, употребляемый для фиксации вирусов растений, диализовался быстро. Уже после 3 часов диализа пикриновая кислота в препарате не была обнаружена.

Специальные опыты были посвящены выяснению степени влияния температуры на скорость диализа через парлодиевые пленки по методу капельного диализа.

Сравнивалась скорость диализа при температурах 16—18° и 30° через пленки, полученные из 0,02 мл 2% раствора парлодия в амилацетате. Капли наносились на поверхность 50 мл воды, налитой в чашки Петри диаметром 10 см.

Диализовался 10% раствор NaCl. Препараты рассматривались в электронном микроскопе через 3, 6, 9, 12, 16 и 18 часов от начала диализа. Оказалось, что через 6 часов при 30° диализ полностью заканчивался, между тем как при 16° на пленке еще оставалось значительное количество мелких кристаллов хлористого натрия. Полное исчезновение NaCl при этой температуре удалось наблюдать лишь спустя 16 часов после диализа.

Большое влияние на скорость диализа также оказывает толщина пленки. Через пленку, полученную из капли раствора парлодия объемом 0,01 мл, диализ хлористого натрия заканчивался через 3—4 часа. Из капли объемом 0,02 мл — через 6—7 часов, из капли объемом 0,05 мл — через 24 часа. Через пленку, образованную каплей объемом 0,075 мл, диализ не закончился даже после 30 часов.

В приведенных сравнительных опытах капли 2% раствора парлодия различной величины наносились на поверхность 50 мл дестиллированной воды в чашке Петри диаметром 10 см. Применялся 10% раствор NaCl. Диализ проводился при температуре 18—20°.

Метод капельного диализа обеспечивает не только нужную очистку препаратов, но и оказался весьма полезным для изучения с помощью электронного микроскопа онтогенеза микробных форм, различных стадий индивидуального развития клеток. Благодаря достаточно большому сроку диализа веществ из МПБ и синтетических сред, в капле этих сред на диализирующей пленке возможно развитие микроорганизмов; растущие и размножающиеся клетки при этом располагаются в препарате естественно и после окончания диализа доступны наблюдению в очищенном от маскирующих примесей виде.

Метод капельного диализа облегчает также условия для электронно-микроскопических исследований процессов изменений в клетках, вызываемых действием разнообразных физических, химических и биоло-

гических агентов. Он позволяет проследить в динамике характер воздействия различных факторов на биологические объекты, поскольку по желанию экспериментатора легко варьировать концентрацию или экспозицию действия нужного фактора на объект, заключенный в капле среды на «предметном стекле», являющемся диализирующей перепонкой.

Выводы

1. Описан метод очистки биологических препаратов для целей электронной микроскопии. Данный метод, названный методом капельного диализа, основан на принципе использования опорной коллодионной пленки — «предметного стекла» в электронномикроскопических исследованиях в качестве диализирующей перепонки.

2. Метод капельного диализа также облегчает возможность электронномикроскопического изучения стадий онтогенеза клеток или характера изменений в них под влиянием разнообразных физических, химических и биологических агентов.

Кабинет электронной микроскопии
Отделения биологических наук
Академии Наук СССР
Москва

Получено 14.VI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаев Б., Крисс А. и Рукина Е. Некоторые наблюдения над цитологией бактерий с помощью электронного микроскопа. Изв. АН СССР, серия биологическая, № 6, стр. 678, 1945.
2. Mudd St. a. Anderson Th. Selective «Staining» for electron micrography. J. Exp. Med., v. 76, p. 103, 1942.

ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

(Обзор)

М. П. Корсакова

В группу денитрификаторов входят палочковидные бактерии, совершенно различные по морфолого-систематическим и биохимическим признакам; Olden (1940) проводил опыты с Micrococcus denitrificans. Наибольшее внимание среди денитрификаторов уделено представителям рода Pseudomonas, затем рода Achromobacter; мало данных мы имеем о денитрифицирующих споровых палочках. Среди облигатных анаэробов денитрификаторов пока не найдено; среди термофилов они встречаются; Имшенецкий (1941) выделил денитрификаторов-термофилов. При всем разнообразии денитрификаторы имеют один общий биохимический признак: наличие наряду с обычной дыхательной системой специфической окислительно-восстановительной системы, активирующей в качестве акцептора водорода нитраты или нитриты. В настоящее время установлено, что ход восстановления нитратов регулируется не только особенностями культур, но и внешними условиями, в первую очередь соотношением между количествами органического вещества и нитратов. Отношение к нитратам иногда варьирует у различных культур одного вида. Имеющиеся по восстановлению нитратов данные часто не сравнимы между собой ввиду отсутствия стандартной методики; подход к решению вопроса о способности бактерий восстанавливать нитраты часто бывал чисто эмпирическим, без учета особенностей культур и теоретических положений, объясняющих механизм восстановления нитратов.

Несмотря на большое количество исследований, вопрос о роли денитрификаторов в естественных условиях нельзя признать решенным. Количественный учет их в почве не дает представления о ходе денитрификации; имеющиеся лабораторные методы для изучения хода денитрификации далеко не совершенны. От прежних взглядов о больших потерях азота из почвы и морей путем денитрификации наблюдается переход к совершенно противоположным взглядам: Prince, Tath, Blair и Bear (1941) установили, что наилучшим искусственным удобрением являются нитраты, заключая из этого, что в почве денитрификация не препятствует усвоению нитратов. Исаченко (1914, 1916, 1937), Waksman, Hotchkiss и Carey (1933) придерживаются взгляда, что в морях процессы денитрификации, как полагал Брандт, значительной роли не играют. К мнению Брандта присоединяются Zo Bell (1946), который нашел, что из всех выделенных из моря бактерий, восстанавливающих нитраты, только 5% доводит восстановление до свободного азота. Zo Bell считает, что ввиду недостатка в море органических соединений биологическое восстановление нитратов до свободного азота является проблематичным; вопрос этот было бы интересно рассмотреть в связи с данными, собранными Горюновой (1948) о количестве растворенных в морской воде органических соединений. Основываясь на изучении механизма денитрификации и влиянии на нее внешних условий, нельзя совершенно отрицать возможность биологических потерь свободного азота из почвы, которые при pH выше 7 могут, как показали Madhok и Uddin (1946), итти и чисто химическим путем. Corbet и

Wooldridge (1940) считают, что в почвах Англии происходят в аэробных условиях биологические процессы, которые ведут к потерям азота. Обилие усвояемого органического вещества, неблагоприятные условия аэрации почвы при наличии нитратов или нитритов содействуют потерям азота путем денитрификации. Каковы размеры таких потерь в действительности, имеют ли они какое-нибудь практическое значение и каковы ограничивающие их в отдельных случаях факторы,— все эти вопросы еще ждут разрешения.

Наиболее полные данные по распространению денитрификаторов в почвах мы имеем в русской литературе. Изучение микробиологии почв, озер, морей и лечебных грязей Союза широко развернулось за последние 30 лет. Большинство работ проведено методом группового анализа, в них содержатся данные о количестве денитрификаторов на различной глубине, о колебаниях их числа в различные времена года, о влиянии обработки и орошения на их развитие. Работы последних лет пополнили наши сведения о распространении денитрификаторов в тундровых и полярно-пустынных почвах (Исаченко и Симакова, 1934; Крисс, 1947), иловых отложениях (Штурм и Канунникова, 1945; Мессинева, 1948), озерах (Копп и Лимберг, 1945), лечебных грязях (Тутаева и Моносова, 1946), морях и океанах (Крисс, 1945; Гурфейн, 1945). Все данные свидетельствуют о широком распространении денитрификаторов в почве, особенно в ризосферах (Красильников, 1944; Clark, 1940; Mitchell a. Clark, 1942).

В течение 10—15 последних лет происходит формирование новой отрасли общей микробиологии (Feher, 1946) — экологии микроорганизмов. Огромный материал о приспособлении микробов к условиям внешней среды подвергается пересмотру и систематизации (Мишустин, 1947).

Особенно большую роль в будущем должно играть определение видового состава и ведущих форм микроорганизмов. Имеющиеся в литературе данные о распределении бактерий, в частности денитрификаторов, касаются главным образом их группового состава, без определения видов и ведущих форм, относительно которых мы имеем только отдельные сведения, (Coloman, Reid a. Farrel, 1943). Потапов (1930) установил сравнительное количество Bact. Stutzeri и Bact. denitrofluorescens для черноземных почв, а Литвинова (1933) — для оподзоленных, Буткевич (1938) показал, что в устье и дельте Волги денитрификаторы представлены только одним видом; в более засоленных местах этот вид заменен другим. Мой анализ видового состава денитрификаторов показал, что ведущие денитрификаторы некоторых почв Ленинградской области отличаются от ведущих форм Вологодской области. В первой громадное большинство денитрификаторов принадлежит к роду Pseudomonas, во второй бактерии этого рода встречаются редко; почти все выделенные из различных мест денитрификаторы принадлежат к одному виду Achromobacter siccum n. sp. (Корсакова, 1938), культуры которого отличаются друг от друга по биохимическим признакам. Эти данные показывают, какое большое значение с экологической точки зрения имеет определение видов, а может быть и разграничение денитрификаторов.

Большое внимание за последнее время было уделено классификации рода Pseudomonas, к которому принадлежит значительное число денитрификаторов. Классификация эта наталкивается на те же затруднения, как и вообще классификация бактерий, в особенности в связи с изменчивостью отдельных культур. Van Niel (1944) нашел сходство между несерными пурпурными бактериями и бактериями с полярными жгутиками рода Pseudomonas, не способными к фотосинтезу; он предложил выделить их в новый отряд Pseudomonodales. Breed, Muray и Hitchens (1944) считают, что эта точка зрения заслуживает рассмотрения. Selen и Stark (1943) попытались разделить на группы 199 культур

выделенных ими флуоресцирующих бактерий на основе чисто физиологических признаков: отношению к температуре, влиянию на молоко и желатину и восстановлению нитратов; они дифференцировали 14 групп. Munoz, Sherago и Weaver (1945) установили с серологической точки зрения гетерологичность рода Pseudomonas. Elrod и Braun (1942) тоже обнаружили среди выделенных ими 17 культур Pseudomonas различные серологические типы. Gaby (1946), интерес которого сосредоточился на Pseudomonas aeruginosa как продуценте антибиотиков и в известной мере патогенном виде, установил, что выделенные им культуры легко диссоциируют с образованием по меньшей мере трех типов: A, B и R. Красильников (1947), отмечая, что обычной основой для определения видов бактерий являются их энзиматические свойства, подчеркивает, что при расщеплении рас Pseudomonas fluorescens он получал изменение протеолитических свойств бактерий, их способности сбраживать сахара и восстанавливать нитраты. Tobie (1945) считает, что неоднородность химической природы флуоресцирующих пигментов разных представителей рода Pseudomonas дает основание для дифференциации этого рода. Fastier (1945) путем селекции на агаре разделил культуру Pseudomonas aeruginosa, на два типа: фагосенсибельный и фагорезистентный. Род Pseudomonas включает в себя крайне изменчивые культуры, так что для его правильной классификации необходимо изучение всей совокупности морфологических, биохимических и серологических признаков, химического состава пигментов и фаготипажа, который в настоящее время широко применяется в отношении некоторых видов бактерий. Остается открытым вопрос, в какой мере в качестве систематического признака могут быть в стандартизированных условиях применены способность и характер восстановления нитратов. Свойство это непостоянно, но и те биохимические свойства, на которых часто основывается разделение бактерий на виды, тоже непостоянны.

В отношении механизма денитрификации за последнее время не было внесено ничего принципиально нового в трактовку тех положений, которые мною были выдвинуты (Корсакова, 1934). Мы должны смотреть на восстановление нитратов как на окислительно-восстановительный процесс, суммарно изображаемый обычной формулой денитрификации. По существу этот процесс слагается из трех последовательно идущих окислительно-восстановительных процессов, каждый из которых активируется отдельной, сложной и хотя бы в определенной ее части самостоятельной ферментативной системой. В методическом отношении были достигнуты некоторые успехи. При исследовании денитрификации и был применен аппарат Варбурга (Olden, 1940). Bachmann и Weaver (1947) выработали быструю методику для определения способности бактерий восстанавливать нитраты до нитритов.

По влиянию внешних условий на ход денитрификации, за исключением влияния аэрации, накопилось тоже немного новых данных. Karlsen (1943), исследуя значение для денитрификации pH среды, получил данные, сходные с данными Захаровой (1923); минимум лежит в пределах pH = 5,6—6, оптимум 7—8, а максимум 9. При крайних пределах pH происходит накопление нитритов. Этот факт может быть обусловлен только тем, что первое звено денитрификации — восстановление нитратов до нитритов — менее чувствительно к неблагоприятным pH, чем следующее за ним восстановление нитритов. Накопление нитритов подавляет денитрификацию в кислой и нейтральной среде, так что она прекращается при pH ниже 7. Присутствие железа необходимо для правильного хода денитрификации; когда оно находится в достаточных количествах, то в пределах между pH = 7,5 и 8,7 нитриты совершенно не обнаруживаются. При недостатке железа происходит накопление нитритов. Опять мы видим, что отдельные звенья денитрификации различно реагируют на изменение внешних условий.

В 1930 г. Lloyd и Cranston еще придерживались взгляда, что аэрация снижает или прекращает денитрификацию. Постепенно было окончательно опровергнуто то представление, что денитрификация, являясь источником энергии, идет только в анаэробных условиях, и стал накопляться материал по влиянию аэрации на процесс восстановления нитратов. Крючковой и Корочкиной (1936) было установлено, что денитрификация не требует высоких rH. Olden (1940), изучая в аппарате Варбурга восстановление нитратов до свободного азота за счет окисления уксуснокислого натрия, показал, что анаэробный газовый метаболизм на нитратах имеет тот же порядок, как и аэробный; количество освобожденного азота соответствует количеству восстановленных нитратов; промежуточные нитриты не обнаруживаются. Он рассматривает нитрат-редуктазу как адаптивный фермент в понимании Karström.

В отношении влияния кислорода на восстановление нитратов можно представить две альтернативы: 1) аэрация действует угнетающе на биохимический процесс восстановления; 2) аэрация, не действуя на этот процесс как таковой, обусловливает создание условий, вызывающих прекращение или снижение скорости денитрификации. Выяснить первый вопрос можно только в опытах с покоящимися бактериями при избытке донаторов водорода. Между отдельными денитрификаторами обнаруживается при такой постановке несомненная разница. Мои кратковременные опыты (1941) с Pseudomonas denitrificans, Pseudomonas fluorescens, с Achromobacter siccum и споровыми, близкими к Bacillus subtilis бактериями показали, что при достаточном количестве донаторов водорода аэрация не действует угнетающе на денитрификацию, только недостаток органического вещества, быстро используемого при дыхании, ограничивает восстановление нитратов. Буткевич (1941) считает, что обычно у денитрификаторов при обильной аэрации не наблюдается полного прекращения, а только задержка восстановления нитратов, так как и в аэробных условиях оно доходит до конца. У морской бактерии Achromobacter arcticum n. sp. он, однако, наблюдал подавление денитрификации при аэрации; только в анаэробных условиях или в условиях слабой аэрации она доходила до конца. Весьма вероятно, что различие во влиянии доступа кислорода на отдельные денитрификаторы связано с относительной активностью двух их окислительно-восстановительных систем: дыхания и восстановления нитратов. Возможно, что в обеих системах окисление органического вещества вызывается теми же ферментами, в таком случае причина задержки денитрификации при аэрации делается вполне понятной. Вопрос о влиянии аэрации на процесс денитрификации требует еще дальнейшего изучения, особенно в отношении разницы не только между отдельными видами, но и между различными культурами одного вида. Интересно также сравнение хода развития бактерий в аэробных условиях и при анаэробиозе в присутствии нитратов. Мои опыты с четырьмя видами бактерий на различных источниках углерода показывают, что в обоих случаях в конце опытов получается одинаковое количество бактерий на 1 см^3, только на нитратах развитие идет более медленно. Сходные результаты были получены Буткевичем в отношении Achromobater arcticum; он, однако, считает, что некоторые денитрификаторы дают на нитратах лишь незначительное развитие.

С точки зрения хода денитрификации в естественных условиях чрезвычайно большое значение имеет тот факт, что и в аэробных условиях дыхание и денитрификация могут итти у бактерий одновременно при наличии достаточного количества органического вещества.

Рассматривая денитрификацию как окислительно-восстановительный процесс, который может итти в клетке наряду с дыханием, приходится остановиться прежде всего на специфичности в отношении донаторов водорода этих двух окислительно-восстановительных систем. Мы имеем

большой фактический материал, особенно разросшийся за последнее время, относительно пригодности различных органических соединений быть источником энергии при дыхании отдельных групп денитрификаторов; денитрификаторы, в особенности принадлежащие к роду Pseudomonas, широко используют при дыхании самые разнообразные источники углерода (Kazai, 1943). До сих пор, однако, во многих случаях не выяснено, в какой мере эти последние могут служить донаторами водорода и при восстановлении нитратов. Фактов, доказывающих обратное, немного; в громадном большинстве экспериментально проверенных случаев органические соединения, окисляемые в процессе дыхания, могут окисляться и в процессе денитрификации.

За последние годы было уделено сравнительно много внимания использованию бактериями различных углеводородов в качестве источников энергии (Schuman, Farrel and Stone, 1943). Haas (1941) установил, что не меньше 66% всех выделенных им окисляющих углеводороды бактерий принадлежит к роду Pseudomonas. Способность использовать углеводороды широко присуща этому роду: 95% исследованных им культур могли окислять углеводороды. Возможность окисления отдельных угеводородов стоит в зависимости от их химического строения: длины цепи (Stravinski a. Stone, 1942), структуры и наличия тех или иных радикалов (Johnson, Goodale a. Turkevich, 1942). Наиболее успешный рост идет на высших парафиновых углеводородах; на углеводородах со сравнительно короткой цепью рост или совсем не идет, или идет крайне медленно. ZoBell выяснил, что все 13 видов Pseudomonas, им исследованных, способны окислять те или другие углеводороды. В своей сводной работе (1946) он дает полную картину современных знаний о воздействии микроорганизмов на углеводороды, охватывая и денитрифицирующих бактерий. Bushnell (1941) нашел, что при усвоении углеводородов бактериями рода Pseudomonas существенное значение имеют фосфаты; он предполагает, что фосфорилирование играет в метаболизме углеводородов ту же роль, как и в метаболизме углеводов. Калиненко (1938) считал, что Pseudomonas fluorescens не способна разлагать углеводороды каучука. Однако ZoBell нашел, что окисление каучука, которое главным образом идет за счет деятельности актиномицетов и проактиномицетов, воспроизводится также и Pseudomonas fluorescens. ZoBell показал, что имевшаяся у него культура Pseudomonas fluorescens окисляла в чистой культуре очищенный каучук. Разница в полученных этими двумя авторами данных объясняется, очевидно, особенностями отдельных культур в пределах одного вида Pseudomonas.

Ароматические соединения являются обычными составными частями клетки и понимание их метаболизма очень важно с точки зрения сравнительной биохимии. Почвенные бактерии, в частности Pseudomonas, представляют собой благодарный материал для изучения деградации бензольного кольца, так как они способны далеко вести аэробное окисление ароматических соединений. Вопрос о ходе окисления ароматических соединений бактериями был выдвинут Таусоном (1929); Bernheim (1942) продолжал это изучение; Stanier (1948) на 20 выделенных им из почвы культурах Pseudomonas показал, что они могут окислять многие ароматические соединения и что это свойство носит исключительно специфический характер. Специфичность в отношении донаторов водорода является характерной особенностью денитрификаторов и проявляется как при дыхании, так и при восстановлении нитратов. Stein (1942), сравнивая пригодность различных методов для определения утилизации углеводов отдельными видами Pseudomonas, пришел к заключению, что наилучшим методом является определение наличия и скорости роста бактерий. Все 24 исследованные им культуры окисляли глюкозу; мальтозу окисляло большинство культур, сахарозу же и лактозу — лишь немногие. Большая специфичность проявляется в отношении виннокислых

солей: Achromobater Stutzeri проводит денитрификацию за счет винно-кислых солей, в то время как многие денитрификаторы не могут их использовать. Из 12 исследованных мною культур, принадлежащих к различным родам и видам Pseudomonas и Achromobacter и споровым палочкам, близким к Bact. subtilis, ни один не был в состоянии проводить денитрификацию за счет виннокислых солей; все они окисляли при восстановлении нитратов многие углеводы, спирты. и кислоты, включая уксусную. 4 из этих культур вели денитрификацию, хотя и значительно более медленно, и на муравьиной кислоте. Своеобразные специфические свойства проявляет выделенная Русаковой и Буткевичем (1941) морская бактерия Achromobacter arcticum. Она не утилизирует лучших для большинства денитрификаторов донаторов водорода: углеводов и лимонной кислоты; из 19 испробованных источников углерода эта бактерия развивается только на 6 одноосновных и двухосновных кислотах: уксусной, масляной, валерьяновой, молочной и яблочной.

Ввиду того что Achromobacter arcticum не дает развития на лимонной кислоте, Буткевич считает, что эту кислоту следует перестать считать универсальным для всех денитрификаторов источником углерода, и предлагает заменить ее в обычной среде Гильтея яблочной кислотой.

Исследуя отношение различных представителей рода Pseudomonas к ароматическим соединениям, Stanier (1947) нашел, что адаптация к ним носит исключительно специфический характер; он считает, что бактерии этого рода имеют отдельные механизмы для окисления каждого отдельного из таких соединений, как фенол, парагидробензойная кислота, фенилуксусная кислота, ход окисления которых он изучал.

Различные донаторы водорода активируются при денитрификации одной и той же культурой с неодинаковой скоростью; в моих опытах с Bact. amylolyticum полное восстановление нитратов до свободного азота за счет аминокислот шло с большой медленностью и требовало продолжения опыта до 5 суток, тогда как за счет глюкозы оно оканчивалось в 24 часа.

Вопрос, касающийся сравнения хода активации различных донаторов водорода двумя окислительно-восстановительными системами, присущими денитрификаторам, до сих пор еще в достаточной мере не освещен. Систематическая экспериментальная проверка этого сложного вопроса дала бы возможность лучше разобраться в жизнедеятельности денитрификаторов в естественных условиях. В первую очередь требуют разрешения следующие вопросы: 1) все ли донаторы водорода, которые активируются при дыхании, активируются и при восстановлении нитратов и 2) какова относительная скорость активации донаторов водорода при том условии, что оба процесса идут одновременно. Мои исследования целого ряда денитрификаторов показывают, что необходимо различать энергичных денитрификаторов, у которых скорость восстановления нитратов при определенных условиях может превышать скорость дыхания или равняться ей, и слабых, у которых всегда наблюдается обратное явление. Сравнительная скорость восстановления нитратов и дыхания меняется в зависимости от донаторов водорода и особенностей культур. Мои опыты с восемью различными донаторами водорода в отношении 12 вышеупомянутых культур, принадлежащих к различным родам бактерий, проведенные в водной среде при доступе кислорода, дали возможность сделать некоторые заключения о характере этих изменений; основным из них является то, что характер изменений находится в связи с биохимическими особенностями отдельных родов бактерий; окислительно-восстановительные системы отдельных культур одного вида по своему характеру большей частью близки между собой, хотя иногда встречаются и отклонения в этом отношении; при том условии, что количество органического вещества в опыте менялось от нормы донатора водорода, необходимой для полного его восстановления, до количеств,

превышающих эту норму в 5 раз, можно было сделать выводы о сравнительной скорости двух одновременно идущих окислительно-восстановительных процессов: дыхания и восстановления нитратов. Все исследованные культуры Achromobacter активируют спирты, глицерин и этиловый спирт более энергично при восстановлении нитратов, чем при дыхании; глюкоза и лимонная кислота активируются значительно слабее. Ввиду этого в том случае, когда донаторы водорода были даны по норме, у одной культуры Achromobacter дыхание за счет глюкозы идет настолько быстрее, чем восстановление нитратов, что за 5 дней опыта, несмотря на полное потребление глюкозы, успело восстановиться только 24% внесенных нитратов; восстановление не дошло до конца, образования свободного азота совсем не наблюдалось; прошла, как обычно бывает при недостатке донатора водорода, главным образом первая фаза: восстановление до нитритов; отчасти, как видно из учетов форм азота, вторая фаза — восстановление до нитроксила, третья же фаза — образование свободного азота — совсем не имела места. На спиртах при тех же условиях опыта восстановление нитратов шло значительно дальше. Наиболее выгодными донаторами водорода для денитрификаторов рода Pseudomonas являются в условиях аэрации глюкоза и лимонная кислота, которые из двух окислительно-восстановительных процессов особенно энергично активируются при восстановлении нитратов. Кузин (1946) признает универсальным углеводом для всех патогенных бактерий глюкозу; такую же роль глюкоза играет у большинства денитрификаторов. При восстановлении нитратов органические соединения во многих случаях окисляются до углекислоты: согласно моим данным, так идет окисление глюкозы, лимонной, молочной и уксусной кислот, глицерина и этилового спирта для многих денитрификаторов, принадлежащих к родам Pseudomonas и Achromobacter и споровым палочкам. Stein (1942) отмечает, что многие виды Pseudomonas при дыхании потребляют сахара без образования кислот. В своих опытах с Bact. denitrificans Корочкина (1945) показала, что в анаэробных условиях окисление молочной кислоты идет пропорционально восстановлению нитратов; молочная кислота, судя по балансу кислорода, окисляется не до углекислоты, а до промежуточных продуктов муравьиной и уксусных кислот. Как показали Chen и Tany (1940), Pseudomonas aeruginosa при дыхании окисляет пировиноградную кислоту прямо до уксусной кислоты и углекислоты, минуя ацетальдегид. Так ли в этом случае идет окисление при восстановлении нитратов, пока не выяснено.

Различные виды Pseudomonas часто, хотя и не неизменно, характеризуются способностью, свойственной группе Acetobacter, к окислению спирта в уксусную кислоту; в присутствии углекислого кальция уксусная кислота накопляется в 50% от теоретического выхода. Из 12 выделенных Stanier (1947) культур Pseudomonas fluorescens 9 окисляли спирт в уксусную кислоту; единственная выделенная им культура Pseudomonas aeruginosa этим свойством не обладала. В отсутствие углекислого кальция образование уксусной кислоты идет лишь очень слабо, только присутствие углекислого кальция препятствует ее накоплению. Не указывает ли это на то, что внесение углекислого кальция вызывает изменение хода реакции подобно тому, как это констатировано при брожении? В моих опытах с 12 бактериями, о которых упоминалось выше, окисление спирта при денитрификации в отсутствие углекислого кальция шло до углекислоты. До последнего времени окислительным процессам Pseudomonas уделялось сравнительно мало внимания; новейшие работы показывают, что эти процессы представляют много интересного. Evans (1947) изучал окисление ароматических соединений почвенными бактериями, между прочим Pseudomonas rathonis; он установил, что катехол берет при окислении на один атом кислорода меньше, чем фенол, являясь промежуточным продуктом окисления

последнего; то же можно сказать и о *m*- и *p*-гидроксибензойной и бензойной кислотах. Часто предполагалось, что бактерии рода Pseudomonas как характерные аэробы неизменно доводят окисление до полной минерализации. Встречались указания на возможность и иного хода окисления глюкозы. Первозванский (1939) первый выдвинул вопрос о ходе окисления у флуоресцирующих бактерий. Дальнейшие исследования по образованию из глюкозы различными видами Pseudomonas глюконовой, кетоглюконовой и α-кетоглютаровой кислот были выполнены Lockwood и Nelson (1946). Большинство приведенных данных о ходе окисления органических соединений относится к окислениям за счет молекулярного кислорода, и в этом случае было бы важно установить ход их окисления в процессе восстановления нитратов.

Азотный метаболизм денитрификаторов тесным образом связан с их окислительно-восстановительной системой. В подавляющем большинстве случаев они принадлежат к той группе бактерий, которые наряду с другими источниками азота способны использовать и нитраты. Porter (1946) разделяет усваивающие нитраты и нитриты бактерии на такие, для развития которых на этих источниках азота необходимы ростовые вещества, и такие, которые могут развиваться в отсутствие последних. Значительная часть, а может быть и все усваивающие нитраты денитрификаторы принадлежат к последней группе: они прекрасно развиваются на синтетической среде с нитратами без прибавления ростовых веществ. Отношение бактерий к использованию источников азота иногда, по мере их хранения в лаборатории, меняется. Этот факт является лишней причиной для признания несостоятельности попытки Lochhead и Chase (1943) разделить почвенных бактерий на группы в зависимости от их потребности в азотистом питании (Kopper, 1947). Способность денитрификаторов усваивать нитраты обусловлена тем, что, кроме специфической для них окислительно-восстановительной системы, активирующей восстановление нитратов до свободного азота, они имеют еще и свойственную многим другим бактериям систему, доводящую восстановление нитратов до аммиака. Не все денитрификаторы, однако, усваивают нитраты, следовательно, некоторые из них лишены второй системы. После работы Корсаковой с почвенной бактерией № 208, не дававшей роста на нитратах, а развивавшейся на аммонийных солях и аминокислотах, Русаковой и Буткевичем (1941) была описана морская бактерия, совершенно отличная от первой по другим биохимическим свойствам, но тоже не способная усваивать нитраты. При усвоении нитратов бактериями аммиак образуется в таких ничтожных количествах, что уловить его не удается. Каждый из двух окислительно-восстановительных процессов, свойственных денитрификаторам, представляет цепь последовательно идущих процессов. Первый из этих процессов в обоих случаях идентичен и представляет собой восстановление нитратов в нитриты. Woods (1938) дал точную картину восстановления нитратов до аммиака с промежуточным образованием нитритов для бактерии Clostridium Welchii, активирующей в качестве донатора водорода молекулярный водород. Нужно думать, что дальнейшее восстановление нитритов до аммиака идет, как нашли Azo, Migita и Ihdo (1939), через гидроксиламин. Интересен тот факт, что усвоение свободного азота клубеньковыми идет тоже через гидроксиламин (Damodoran и Vorma, 1944). Таким образом, процесс восстановления нитратов до аммиака (Корсакова, 1941) может иметь с процессом восстановления до свободного азота или одно общее звено — нитраты → нитриты или два: нитраты → нитриты; нитриты → нитроксил. Последнее будет иметь место в том случае, если восстановление нитритов в гидроксиламин идет не прямо, а через нитроксил. Разобраться в громадном материале, касающемся окислительно-восстановительных процессов денитрификаторов, можно только в том случае, если подходить к нему с определенной

теоретической точки зрения. Механизм восстановления одинаков у всех трех процессов, последовательный ход которых приводит к образованию свободного азота, и теоретическое объяснение должно касаться каждого отдельного из них, а не их совокупности. Это дает возможность рассматривать с одной общей точки зрения и все основные, широко воспроизводимые различными группами бактерий восстановления нитратов: до нитритов, нитроксила, свободного азота и аммиака. Под окислениями подразумеваются весьма различные с внешней точки зрения процессы: 1) присоединение кислорода, 2) отнятие водорода, 3) реакции, связанные с перемещением электронов, вызывающие повышение валентности окисляемого соединения. Под восстановлением подразумеваются реакции обратного порядка. Все три группы окислительных процессов путем сопоставления структурных изменений и изменений валентности могут быть объединены под именем окисления. Со времени появления теории Бора о строении атома намечалась тенденция представлять химические реакции исключительно с точки зрения «квантовых перескоков». Однако изучение на снимках рентгеноскопических решеток доказало появление в результате химических реакций новых решеток, т. е. перегруппировок атомов. Основными теориями окисления в настоящее время следует признать теории Баха, Wieland, Warburg и теории, в известной мере обобщающие другие, к которым принадлежат теории Keilin и Szent-Györgii. Вклад русских ученых в лице Баха, Палладина, Костычева и Буткевича в разработку теорий окислительно-восстановительных процессов в биологии чрезвычайно велик. Труды Баха были первыми экспериментально точными работами в этой области; Палладин в своих исследованиях по дыханию растений во многом опередил взгляды современников. Он первый поднял вопрос об окислении как переносе водорода, разработал теорию об участии растительных хромогенов в процессах окисления и указал на роль редуктаз в окислительных процессах. Однако приоритет Палладина не получил признания за границей; в иностранных исторических обзорах по окислительно-восстановительным теориям имя Палладина часто совсем не упоминается. Важным этапом в развитии представлений об окислительно-восстановительных процессах были исследования Tunberg и Quastel, которые, однако, рассматривали их как реакцию между донатором и акцептором водорода, катализируемую дегидразой, активирующей водород, а не как сложную цепь ряда окислительно-восстановительных процессов. Новейшие работы, в частности работы Варбурга, расширили и углубили наши представления о ходе окислительно-восстановительных процессов. С его точки зрения главным и необходимым условием основного дыхательного процесса является активация кислорода за счет ферментов — переносчиков кислорода. Первой ступенью окисления в биологических условиях является мобилизация органического вещества. Точное обоснование учения о строении и деятельности окислительных ферментов, их связи с субстратом устранило ту неопределенность, которая существовала в отношении ферментативной деятельности окислительных ферментов, и установило ход и сущность химических реакций, обусловливающих окисление. Варбург открыл две группы ферментов — переносчиков кислорода. Первым переносчиком кислорода является аутоксидабельный железосодержащий фермент, названный им «дыхательным ферментом», связывание кислорода которым подавляется цианистым калием. Цианистый калий не влияет на мобилизацию водорода, так что при помощи его можно разграничить катализаторы, действующие на кислород, от тех, которые действуют на водород. Такое же ядовитое действие оказывает окись углерода. Дыхательный фермент способен реагировать только со специфическими партнерами, молекулярным кислородом и железосодержащим протеидом — цитохромом Кейлина; он окисляется,

присоединяя кислород, цитохром же восстанавливает последний, регенерируя дыхательный фермент; аутоксидабельной является только закисная форма дыхательного фермента, кислород которого передается последовательно трем цитохромам, последний из которых восстанавливается субстратом — органическим соединением. Варбург признает дыхательный фермент основным фактором дыхания. Вторым окислительным ферментом, исследованным им, является аллоксазин-нуклеотид, связанный с белковым компонентом, «желтый фермент», не содержащий железа, на который цианистый калий не действует; количество его в клетках не велико по сравнению с дыхательным ферментом. Это аутоксидабельный фермент — переносчик мобилизированного водорода на молекулярный кислород. Он восстанавливается, воспринимая два водорода органической молекулы, а затем в присутствии кислорода снова окисляется, отдавая водород молекулярному кислороду, образующему H_2O_2. Имеющийся в настоящее время фактический материал заставляет принять положение, что окислительные процессы осуществляются в виде цепи последовательно идущих реакций, характер которых обусловливается той катализирующей их сложной ферментативной системой, которая воспроизводит мобилизацию как кислорода, так и водорода. Такие исследователи, как Keilin и Szent-Györgyi, как бы обобщили те теории, которые были выдвинуты другими исследователями. Первым основным положением этих обобщающих теорий является то, что окислительно-восстановительные процессы клетки протекают различными путями, при участии различных ферментативных систем; вторым то, что окисление органического вещества протекает через ряд промежуточных реакций, и, наконец, третьим то, что в суммарном окислительно-восстановительном процессе необходимо разграничить два момента: 1) активацию органической молекулы субстрата, в частности его водорода, и 2) активацию кислорода; в окислительно-восстановительной системе активации подвергается как донатор, так и акцептор. Ферментативные окислительно-восстановительные системы многих бактерий в настоящее время уже в значительной мере исследованы. Спектроскопически установлено, что в уксуснокислых бактериях, резко выраженных аэробах, наряду с цитохромом находится и железосодержащий дыхательный фермент — переносчик кислорода. В дрожжевых клетках, в которых Keilin (1933) нашел обычную дыхательную систему, подавляемую присутствием цианистого калия и окиси углерода, присутствует и желтый фермент. Молочнокислые бактерии являются классическим объектом для изучения желтого фермента. Frey, Riedmüller и Almazi (1934) показали, что аэробные, факультативно- и облигатно-анаэробные бактерии отличаются друг от друга по своим окислительным системам. Первые обладают нормальной дыхательной системой, всеми цитохромами и индофенолоксидазой (дыхательным ферментом); факультативные анаэробы не имеют индофенолоксидазы, но имеют цитохромы. Анаэробы не имеют ни одного из этих ферментов. Денитрификация, как и дыхание, является источником энергии. По сравнению с 647 кал., выделенными на одну молекулу глюкозы при дыхании, при восстановлении нитратов с окислением глюкозы до углекислоты выделяется немногим меньше: 600,6 кал.

Современные теоретические представления об окислительно-восстановительных процессах и экспериментальные данные о ферментативных окислительных системах бактерий дают возможность подойти к вопросу о сущности восстановления нитратов. К процессу восстановления нитратов следует применить ту же схему, которая применяется к дыханию. В процессе восстановления нитратов имеет, как и там, место дегидрирование субстрата, воспроизводимое переносчиками водорода через ряд ступеней вплоть до образования углекислоты, сопровождаемое постепенным освобождением энергии. Окисление субстрата — это одно

звено окислительно-восстановительного процесса, сопряженное со вторым звеном — активацией кислорода нитратов и переносом на него водорода, образовавшегося в результате цепи реакций дегидрирования. Разница между дыханием и восстановлением нитратов сводится, таким образом, к тому, что в первом случае активируется молекулярный кислород, а во втором — кислород нитратов.

Окисление мобилизованного водорода субстрата в том случае, когда акцептором являются нитраты, может происходить двумя путями: 1) ферментативная система, та же, что и при дыхании, основным звеном которой является аутоксидабельный металлопротеид, активирует отщепленный от нитратов другими специфическими ферментами кислород, сам по себе не активный, или 2) специфический фермент вызывает как отщепление кислорода нитратов, так и его активацию. В первом случае, кроме нормальной дыхательной системы у бактерий, восстанавливающих нитраты, должна быть еще система, отщепляющая от нитратов кислород, во втором случае специфической для восстанавливающих нитраты бактерий является ферментативная система, не только отщепляющая кислород от нитратов, но и активирующая его.

Выдвинутое мною представление о ферментативных системах, вызывающих восстановление нитратов, подтверждается целым рядом экспериментальных данных, полученных различными авторами в отношении различных фаз, входящих в денитрификацию. Aubel (1938) установил, что восстановление нитратов в нитриты подавляется действием цианатов и наркотиков, так что вызывающая это восстановление ферментативная система состоит из дегидраз, подавляемых наркотиками, и ферментов, активирующих кислород, подавляемых цианистым калием. Lichstein и Soule (1944) показали, что присутствие пиоцианина уничтожает угнетающее действие цианатов на дыхание бактерий. По данным Корочкиной (1945), под влиянием цианатов у денитрификаторов происходит сильная задержка восстановления нитратов при одновременном накоплении нитритов. Дегидрирование субстрата во всех трех звеньях денитрификации может воспроизводиться той же ферментативной системой, возможно общей и с дыхательными процессами. Мобилизация же кислорода нитратов, нитритов и нитроксила требует специфической ферментативной системы. Последним обстоятельством обусловливается то, что каждый из трех окислительно-восстановительных процессов, совокупность которых представляет собой процесс денитрификации, существует самостоятельно у отдельных групп бактерий.

Возможно существование шести групп бактерий:

1. $2KNO_3 \rightarrow 2KNO_2$
2. $[2KNO_3 \rightarrow 2KNO_2]$ и $[2KNO_2 \rightarrow 2KNO]$
3. $[2KNO_2 \rightarrow 2KNO]$ и $[2KNO \rightarrow N_2]$
4. $[2KNO_3 \rightarrow 2KNO_2]$, $[2KNO_2 \rightarrow 2KNO]$ и $[2KNO \rightarrow N_2]$
5. $2KNO_2 \rightarrow 2KNO$
6. $2KNO \rightarrow N_2$

Из всех 6 групп до сих пор не известны только две последние; существование второй группы было мною установлено на примере Bact. turanicum. Исходя из теоретических соображений, можно предполагать, что в природе существуют и две последние группы, но открытие их сопряжено с большими трудностями.

Ферменты, восстанавливающие нитраты, были выделены из животных организмов, молока и картофеля. Jamagata (1939) получил из суспензии Pseudomonas aeruginosa нитритредуктазу и нитратредуктазу, которая в присутствии алкогольдегидразы, субстрата и метиленовой

сини энергично восстанавливала нитраты. Уретан и цианаты подавляли деятельность фермента.

Теоретические положения о характере ферментативных систем, активирующих восстановление нитратов, подтверждаются и экспериментальными данными. Совокупность тех и других показывает, что сближать восстановление нитратов с анаэробными процессами нет основания. Напротив, ферментативная система, активирующая этот процесс, построена по типу систем, активирующих дыхание, не требующих понижения окислительно-восстановительного потенциала среды.

Вологодский институт
эпидемиологии и микробиологии

Получено 24.VIII.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Бах А. Н. Сборник избранных трудов акад. А. Н. Баха. 1937.
2. Буткевич В. С. О бактериальном населении Каспийского и Азовского морей. Микробиология, т. VII, стр. 1005, 1938.
3. Горюнова С. В. Растворенные органические вещества в открытых водоемах. Микробиология, т. XVII, стр. 241, 1948.
4. Гурфейн Л. Н. О бактериях в Японском море. Микробиология, т. XIV, стр. 277, 1945.
5. Захарова Т. М. К вопросу о зависимости процесса денитрификации от реакции среды. Тр. Научн. инст. удобрений, вып. 15, 1923.
6. Имшенецкий А. А. О скорости процессов, вызываемых мезофильными и термофильными бактериями. Микробиология, т. X, стр. 385, 1941.
7. Исаченко Б. Л. Микробиологическая характеристика грунтов и воды Карского моря. Тр. Аркт. инст., т. 82, 1937.
8. Исаченко Б. Л. О гипотезе Брандта и о денитрифицирующих бактериях Черного и Мраморного морей. Журнал микробиологии, т. III, 1916.
9. Исаченко Б. Л. и Симакова Т. Л. Бактериологические исследования почв Арктики. Тр. Аркт. инст., т. IX, 1934.
10. Исаченко Б. Л. Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана, 1914.
11. Исаченко Б. Л. Микробиологические исследования морей в СССР. Микробиология, т. VI, стр. 964, 1937.
12. Калиненко В. О. Роль плесеней, актиномицетов и бактерий в разложении каучука. Микробиология, т. VII, стр. 119, 1938.
13. Копп Ф. И. и Лимберг Е. Л. Микробиологические исследования озер Северного Казахстана. Микробиология, т. XIV, стр. 281, 1945.
14. Корочкина О. И. Окислительно-восстановительный режим денитрификации. Микробиология, т. V, стр. 645, 1936.
15. Корочкина О. И. Механизм окислительных процессов в денитрификации. Микробиология, т. XIV, стр. 57, 1945.
16. Корсаков М. П. Донные отложения как источник вторичного загрязнения рек. Микробиология, т. VII, стр. 766, 1938.
17. Корсакова М. П., Влияние аэрации на процесс восстановления нитратов. Микробиология, т. X, стр. 153, 1941.
18. Корсакова М. П. Восстановление нитратов до аммиака факультативными и облигатными анаэробами. Микробиология, т. X, стр. 299, 1941.
19. Красильников Н. А., Влияние растительного покрова на микробный состав в почве. Микробиология, т. XIII, стр. 187, 1944.
20. Красильников Н. А. Понятие о виде у бактерий. Микробиология, т. XVI, стр. 381, 1947.
21 Крисс А. Е. Микроорганизмы восточной части Сев. Лед. океана. Микробиология, т. XIV, стр. 268, 1945.
22. Крисс А. Е. Микроорганизмы тундровых и полярно-пустынных почв. Микробиология, т. XVI, стр. 437, 1947.
23. Кузин А. М. Химия и биохимия патогенных микробов. 1946.
24. Литвинова К. В. Наблюдения над денитрификацией в подзолистой почве. Тр. Научн. инст. удобр., вып. 108, стр. 76, 1933.
25. Мессинева М. А. Характеристика микрофлоры соленоводных водоемов Таманского полуострова. Микробиология, т. XVII, стр. 153, 1948.
26. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий, Москва, 1947.
27. Первозванский В. В. Окисление углеводов флуоресцирующими бактериями. Химический реферативный журнал, т. VII, стр. 43, 1939.
28. Первозванский В. В. Образование глюконовой кислоты при окислении глюкозы. Микробиология, т. VIII, стр. 199, 1939.

29. Потапов Н. Г. Денитрификация в Средне-черноземной области. Тр. Научн. инст. удобрений, вып. 76, стр. 97, 1930.
30. Русакова Г. С. и Буткевич В. С. Денитрификация без использования нитратов в качестве источника азота. Микробиология, т. X, стр. 137, 1941.
31. Тугаева А. И. и Моносова С. М. Микробиологические исследования биохимических процессов грязи курорта озеро Тагарское Красноярского края. Микробиология, т. XV, стр. 233, 1946.
32. Штурм Л. Д. и Канунникова З. А. Распределение микроорганизмов в пресноводных иловых отложениях. Микробиология, т. XIV, стр. 260, 1945.
33. Aubel E. Sur la réduction des nitrates par Bact. coli. C. R. Soc. Biolog., v. 128, p. 45, 1938.
34. Azo K., Migita M. and Ihdo T. The mechanism of nitrogen utilization by Azotobacter. Soil Sci., v. 48, p. 1, 1939.
35. Bachmann B. and Weaver R. A quick microtechnic for the detection of the reduction of nitrates to nitrites by bacteria. J. Bact., v. 54, p. 28, 1947.
36. Bernheim F. The oxydation of benzoic acid and related substances by certain mycobacteria. J. Biol. Chem., v. 143, p. 383, 1942.
37. Braun A. C. and Elrod R. P. Pseudomonas aeruginosa plant patogen. J. Bact., v. 43, p. 40, 1942.
38. Breed R. S., Muray E. G. and Hitchens P. Outline classification in the Berdgey Manuel. Bact. Rev., v. 8, p. 255, 1944.
39. Bushnell L. D. and Haas H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bact., v. 41, p. 653, 1941.
40. Chen H. K. and Tany P. S. Studies on the kinetics of cell respiration. J. Cell. and Comp. Physiol., v. 16 (3), p. 263, 1940.
41. Clark F. E. Notes on types of bacteria associated with plant rots. Trans. Kansas Acad. Sci., v. 43, p. 75, 1940.
42. Coleman M. F., Reid J. J. and Farell M. A. Occurence of species of Pseudomonas. J. Bact., v. 45, p. 38, 1943.
43. Corbet A. B. and Wooldridge W. K. The nitrogen cycle in biological systems. Biochem. J., v. 34, p. 1036, 1940.
44. Damodoran M. and Keralu Vorma. Hydroxylamin in root nodules. Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B., v. 19, p. 9, 1944.
45. Elrod R. P. and Braun A. C. Pseudomonas aeruginosa, its role as a plant patogen. J. Bact., v. 44, p. 644, 1942.
46. Evans W. C. Oxydation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria. Biochem. J., v. 41, p. 373, 1947.
47. Fastier L. B. A bacteriophage for Pseudomonas pyocyanea. J. Bact., v. 50, p. 301, 1945.
48. Feher D. La vie des sols désertiques. Inst. Bot. de l'Univ. Hongroise. Sopron. No. 10, p. 1, 1946.
49. Frey W., Riedmüller L. u. Almazi F. Ueber Cytochrom und das Atmungssystem der Bakterien. Biochem. Z., Bd. 274, S. 253, 1934.
50. Gaby W. L. A study of the dissociative behaviour of Pseudomonas aeruginosa. J. Bact., v. 51, p. 217, 1946.
51. Haas H. F. Microbial utilization of hydricarbons. Trans. Kansas Acad. Sci., v. 44, p. 39, 1941.
52. Jamagata S. Ueber die Nitratreduktase und die Nitritreduktase eines neuen Enzyms von Bact. pyocyaneum. Acta Phytochim., v. 11, p. 145, 1939.
53. Johnson F. H., Groodale W. F. and Turkevich J. The bacterial oxydation of hydrocarbons. J. Cel. Comp. Physiol., v. 19, p. 163, 1942.
54. Karlson A. Denitrification and hydrogen on concentration. Biol. Abstr., v. 14, No. 7194, 1943.
55. Kazai L. A. The metabolism of Pseudomonas fluorescens as interpreted by the relationship betweenn metabolic end products and the electrical conductivity of the culture medium. J. Bact., v. 45, p. 277, 1943.
56. Keilin D. Cytochrome a intracellular respiratory enzyme. Ergebn. Emzymforsch., v. 2, S. 239, 1933.
57. Kopper P. H., An atypical strain of Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. v. 54, p. 359, 1947.
58. Lichstein H. C. and Soule M. H. Studies of the effect of sodium azide on microbic growth and respiration. J. Bact., v. 47, p. 239, 1944.
59. Lloyd B. a. Cranston J. A. Studies in gas production by bacteria. Biochem. J., v. 24, p. 529, 1930.
60. Lochhead A. G. and Chase F. E. Qualitative studies of soil microorganisms. Soil Sci., v. 55, p. 185, 1943.
61. Lockwood L. B. and Nelson G. E. The oxydation of pentoses by Pseudomonas. J. Bact., v. 42, p. 581, 1946.
62. Madhok M. R. and Uddin F. Losses of nitrous nitrogen from soils on desiccation. Soil. Sci., v. 61, p. 274, 1946.

63. Mitchell R. B. and Clark F. E. Factors affecting the activity of Pseudomonas-Phytomonas fluorescent bacteria in soil. J. Bact., v. 44, p. 141, 1942.
64. Munoz J., Scherago M. and Weaver R. H. A serological study of the members of the Pseudomonas genus. J. Bact., v. 49, p. 524, 1945.
65. van Niel. The culture, general physiologie, morphologie and classification of the non sulfur purple and broun bacteria. Bact. Rev., v. 8, p. 1, 1944.
66. Olden E. Manometric investigations on bacterial denitrification. K. Akad. Wetenschap. Amsterdam. Ald. Naturk., v. 43 (5), p. 635, 1940. Biol. Abstr., v. 21.
67. Porter J. R. Bacterial chemistry and physiology. N. Y., 1946.
68. Prince A. L., Tath S. J., Blair A. W. and Bear F. E. Forty year study of nitrogen fertilizers. Soil Sci., v. 52, p. 247, 1941.
69. Schuman R. L., Farell M. A. and Stone R. W. Respiratory behaviour of Pseudomonas aeruginosa on hydrocarbons. J. Bact., v. 45, p. 14, 1943.
70. Selen W. A. and Stark C. N. Some characteristics of green fluorescent pigment producing bacteria. J. Bact., v. 46, p. 491, 1943.
71. Stanier R. J. Acetic acid production from ethanol by fluorescent Pseudomonads. J. Bact., v. 54, p. 191, 1947.
72. Stanier R. J. The oxydation of aromatic compounds of fluorescent Pseudomonads. J. Bact., v. 55, p. 476, 1948.
73. Stein L., Wheaver R. H. and Scherago M. Fermentation of some simple carbohydrates by members of the Pseudomonas genus. J. Bact., v. 44, p. 387, 1942.
74. Strawinski R. J. and Stone R. W. The utilization of hydrocarbons by bacteria. J. Bact., v. 43, p. 18, 1942.
75. Tausson W. O. Ueber die Oxydation der Benzolkohlenstoffe durch Bakterien. Planta, v. 7, p. 735, 1929.
76. Tobie W. Proposed biochemical basis for the genus Pseudomonas. J. Bact., v. 49, p. 459, 1945.
77. Waksman S. A., Hotchkiss M. and Carey C. Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. II. Biol. Bull., v. 65, p. 137, 1933.
78. Woods D. D. The reduction of nitrate to ammonia by Clostridium Welchii. Biochem. J., v. 32, p. 2000, 1938.
79. ZoBell C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bact. Rev., v. 10, p. 1, 1946.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Шумаков В. С. **О причинах, задерживающих нитрификацию в лесных почвах.** Почвоведение, № 4, 1948.

Автор изучал процессы аммонификации и нитрификации в почвах двух типов соснового леса. Методика исследований была следующая. В собранных образцах определяли: 1) общий азот — по Иодельбауеру; 2) легкогидролизуемый азот — по Тюрину; 3) аммиачный азот в солевой вытяжке 0,1 *N* KCl колориметрически с помощью реактива Несслера. Нитратный азот определяли в водной вытяжке.

Воднорастворимые продукты осеннего опада и лесных подстилок оказывали на нитрификацию угнетающее действие, аналогичное действию канифоли, таннина, битумов. Токсическое действие воднорастворимых продуктов растительных осадков зависит от типа леса.

А. Тимофеева

Беляков Е. В. **Влияние поглощенного калия на фиксацию азота азотобактером.** Известия АН Казахской ССР. Сер. Физиол. и биох. раст., № 39, вып. 2, 1947.

Изучая распространение азотобактера в целинных и культурных почвах в зоне степи и пустыни Центрального Казахстана, автор установил, что из целинных каштановых почв азотобактер не выделяется, тогда как из сероземов северного Прибалхашья он выделяется довольно часто, несмотря на ряд неблагоприятных моментов в экологических условиях для развития почвенных микроорганизмов. Выясняя положительные факторы, определяющие наличие азотобактера в сероземах северного Прибалхашья, автор изучал значение доступных форм калия. Результаты исследований показали, что фиксация молекулярного азота азотобактером и рост его идет лучше при наличии калия не в растворе, а в поглощенном состоянии.

Преобладание калия над натрием в поглощающем комплексе в некоторых сероземных почвах пустынь Казахстана может быть положительным экологическим фактором для азотобактера.

А. Тимофеева

Гапон Е. Н. **Теория фиксации азота атмосферы микроорганизмами.** Доклады Академии Наук СССР, т. VIII, № 2, стр. 249—252, 1947.

В статье приводятся кратко литературные данные и собственная теория автора о механизм фиксации азота микроорганизмами. Основным положением предлагаемой теории фиксации азота атмосферы является следующее: в результате активированной адсорбции азота ферментом (типа гемоглобина) происходит образование активного нитрида (или активного азота). Последний при наличии водорода восстанавливается прямо до аммиака или через стадии диимида, амида. Источником молекулярного водорода для микроорганизмов являются субстраты. Предлагаемая теория позволяет вывести количественные законы фиксации азота. Приводится вывод одного из основных законов, выражающий зависимость количества фиксированного азота от количества взятого субстрата.

Как показано автором, коэффициент фиксации азота азотобактером для разнообразных субстратов — величина постоянная и равная 220 мг N/г-атом H. Откуда $\mu = 0{,}05$, т. е. только 5% водорода субстрата используются при фиксации азота.

А. Тимофеева

Janke A. **Über die Kopplung der Methangärung mit der mikrobiellen Oxidation olefinischer Doppelbindungen. (Связь между метановым брожением и микробиологическим окислением олефиновых соединений с двойными связями).** Österr. Bot. Z., Bd. 94, H. 113, S. 402—406, 1948.

Автор ставит задачей установить возможность связи между микробиологическими процессами окисления углеводородов до жирных кислот и образования метана из жирных кислот. Для этого была специально разработана методика культивирования совместно анаэробных культур, образующих метан, и аэробных, разрушающих углеводороды. Метановые и углеводородокисляющие бактерии в чистых культурах выращивались в наиболее оптимальных для них условиях для получения наиболее активных

культур и в виде суспензии вносились в прибор, содержащий минеральную среду и углеводород. После 4-недельного культивирования при 28—30° производился газовый анализ. Были получены следующие данные:

№ п/п.	Вариант опыта	к-во газа в см³	% CO_2	% CH_4	% H_2	% остаточного газа
1	KNO_3 добавлен в среду	3,5	2,9	35,7	14,6	46,8 (N_2)
2	KNO_3 не добавлен в среду . . .	3,0	5,2	70,7	20,7	3,4

На основании этих данных автор утверждает, что при взаимном действии углеводородокисляющих бактерий и возбудителей метанового брожения из углеводородов бензина может образоваться метан.

Л. Осницкая

Burkes Sudie and McCleskey C. S. **The bacteriostatic activity of cerium, lanthanum and thallium. (Бактериостатическая активность церия, лантана и таллия).** J. Bact., v. 54, No. 4, pp. 417—425, 1947.

Известно, что соли церия, лантана и таллия даже в малых концентрациях обладают бактериостатическими свойствами. Однако оставалось неясным, имеется ли различие в их токсичности для разных видов микроорганизмов. Авторы изучали токсичность различных концентраций солей $CeCl_3$, $Ce(No_3)_3$, $6H_2O$, $Ce(SO_4)_2$, $LaCl_3$ и $TlNO_3$ на 39 видах бактерий, относящихся к 16 различным родам, и 35 видах грибов, относящихся к 18 родам. Было установлено, что грибы более устойчивы к токсическому воздействию солей церия, лантана и таллия, чем бактерии. Рост исследованных 39 видов бактерий прекращался при следующих концентрациях солей.

$CeCl_3$	от	0,0006	до 0,0012	моля
$Ce(NO_3)_3$	»	0,0004	» 0,0008	»
$Ce(SO_4)_2$	»	0,0006	» 0,0008	»
$LaCl_3$	»	0,0002	» 0,0008	»
$TlNO_3$	»	0,0005	» 0,0010	»

Из солей церия наименее токсичным был $CeCl_3$. Азотнокислые и сернокислые соли показали одинаковую токсичность. По устойчивости к солям церия на последнем месте стояли Aerobacter cloacae, Salmonella aertrycke и Achromobacter lipolyticum. К солям лантана и таллия наиболее чувствительны были представители рода Pseudomonas, а наиболее устойчивы некоторые виды Bacillus, Serratia marcescens, Sarcina conjunctivae и Achromobacter. Понижение pH среды усиливало токсичность $Ce(NO_3)_3$. Токсичность $Ce(SO_4)_2$ уменьшается с прибавлением к среде Na_2SO_4, а токсичность $CeCl_3$ падает в присутствии $MgCl_2$.

Л. Осницкая

Rosenfeld W. D. and ZoBell Cl. E. **Antibiotic production by marine microorganisms. (Образование антибиотиков морскими микроорганизмами).** J. Bact., v. 54, No. 3, pp. 393—398, 1947.

Авторы испытали 58 видов микроорганизмов, выделенных ими из морей, на способность их подавлять развитие различных почвенных и водных культур.

Морские формы выращивались при 27° на жидкой или твердой среде состава: морская вода (75%) 1 000 см³, пептон 5,0 г, дрожжевой экстракт 1,0 г, $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 г, $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ — 0,4 г, и затем переносились на агар с посеянной заранее испытуемой культурой. Через определенные промежутки времени чашки просматривались и по появлению стерильных мест судили о подавлении роста. Оказалось, что 9 видов морских микроорганизмов, в основном принадлежащих к родам Bacillus и Micrococcus, были способны подавлять развитие разных почвенных и водных микроорганизмов. При этом было отмечено, что все исследованные грамположительные виды, за исключением Staphylococcus aureus и Streptococcus faecalis, подавлялись в своем развитии морскими культурами, а грамотрицательные виды были более устойчивыми. Антибиотическое начало, вероятно, тесно связано с клеткой, так как после фильтрования среды с морскими культурами через фильтр Зейца не удавалось показать наличие в фильтрате антибиотических свойств.

Л. Осницкая

Bhat J. V. and Barker H. A. **Studies on a new oxalate-decomposing bacterium Vibrio oxaliticus.** (Исследование новой бактерии Vibrio oxaliticus, разрушающей соли щавелевой кислоты). J. Bact., v. 55, No. 3, pp. 359—369, 1948.

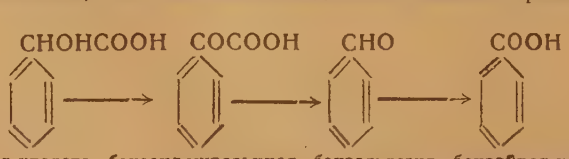
После Bassalik, впервые выделившего бактерий, разрушающих щавелевую кислоту, и изучившего их морфологические и физиологические свойства, долгое время никому не удавалось получить в чистой культуре бактерий, развивающихся на щавелевой кислоте. Полагали, что свойство разрушать щавелевую кислоту присуще лишь немногим микроорганизмам, в основном — плесневым грибам. В результате обследования различных почв и воздуха авторам удалось показать, что бактерии, разрушающие щавелевую кислоту, достаточно широко распространены в почвах. В воздухе их не удалось обнаружить. Культуры выращивались на среде состава: $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 г; K_2HPO_4 — 0,5 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,02 г; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,01 г: $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ — 1 г; 1 000 см³ дестиллированной воды при $t = 28°$, в аэробных условиях. Выделение чистой культуры производилось на агаре с оксалатом и дрожжевым экстрактом. В некоторых опытах вместо щавелевокислого калия применялся щавелевокислый кальций. Выделенные из различных почв бактерии оказались идентичными между собою. Авторы описывают этот организм как типичный вибрион, маленький ($0{,}4 \times 1{,}0\ \mu$), грамотрицательный, подвижный, с полярно расположенными жгутиками. Так как выделенный вибрион не был идентичен с описанным ранее Bassilik Bact. extorquens, он был определен как новый вид и назван Vibrio oxaliticus. V. oxaliticus в присутствии дрожжевого экстракта хорошо развивается также на муравьиной и пировиноградной кислотах, но не в состоянии использовать уксусную, масляную, лимонную, молочную, янтарную, малоновую, малеиновую и винную кислоты. При более длительном культивировании V. oxaliticus мог адаптироваться к уксусной кислоте и развиваться более или менее нормально. Дрожжевой экстракт стимулировал развитие V. oxaliticus и разрушение им муравьиной и пировиноградной кислот. Определение потребления кислорода и дыхательного коэффициента организма на средах с различными источниками углерода показало, что щавелевая и муравьиная кислоты полностью окисляются до CO_2, а пировиноградная частично окисляется до CO_2, а частично используется для клеточного синтеза.

Л. Осницкая

Stanier R. J. **The oxidation of aromatic compounds by fluorescent pseudomonads.** (Окисление ароматических соединений флуоресцирующими бактериями). J. Bact., v. 55, No. 4, p. 477—495, 1948.

Способность флуоресцирующих бактерий разрушать углеводороды, в частности ароматические, неоднократно отмечалась исследователями. Однако при этом мало изучалась биохимическая сторона этого процесса. В настоящей работе делается попытка осветить химизм процесса окисления ароматических соединений бактериями. 22 вида бактерий, относящихся к Pseudomonas pyocyanea, Ps. chlororaphis, Ps. fluorescens, выращивались на минеральной среде (NH_4NO_3 — 0,1%, K_2HPO_4 — 0,1%, $MgSO_4$ — 0,05%) с агаром и с ароматическими соединениями (от 0,01 до 0,005 моля) в качестве источника углерода при 30° в течение 24—72 часов. Затем клетки смывались буферной фосфатной смесью, центрифугировались. 2 см³ суспензии клеток загружались в прибор Варбурга с тем или иным ароматическим соединением. Таким образом определялась не только пригодность ароматического соединения как источника углерода, но и потребление кислорода культурой в процессе развития на этом соединении. Наиболее пригодной для развития бактерий оказалась бензойная кислота. Замещение в бензольном кольце атомов водорода на какие-либо группы вызывало, как правило, понижение биологической активности, а соединения с метильной, метоксильной или аминной группами не использовались ни одним из видов Pseudomonas. Все виды Pseudomonas хорошо развивались на пара-гидроксибензойной кислоте и не давали роста на орто- и метазамещенных. Из других ароматических соединений положительные результаты были получены с бензальдегидом, бензиловым спиртом, фенилацетатом и пара-гидроксифенилацетатом. Два вида хорошо росли на миндальной, коричной, β-фенилпропионовой кислотах и на феноле.

Газометрическими определениями установлено, что ферменты, окисляющие ароматические соединения, адаптивные и строго специфические. Поэтому, если культура выращена на одном ароматическом соединении, то при пересеве ее на другой источник углерода в течение некоторого времени культура развивается слабо и лишь после адаптации к новому ароматическому соединению начинается интенсивное развитие. Есть основание полагать, что окисление миндальной кислоты происходит следующим путем:



миндальная кислота — бензоил-муравьиная кислота — бензальдегид — бензойная кислота

Механизм распада бензойной кислоты пока еще не ясен, некоторые данные говорят в пользу того, что одним из промежуточных продуктов может быть хинная кислота.

Л. Осницкая

Janke A. **Der oxydative Abbau von Benzinkohlenwasserstoffe durch Fluoreszenten.** (Окислительное разрушение углеводородов бензина флуоресцирующими бактериями). Osterr. Bot. Z., Bd. 94, H. 113, S. 385—402, 1948.

Автор выделил из разнообразных источников (почвы, пропитанной нефтью, воды, полученной из нефтяных скважин и нефтехранилищ, экскрементов животных и птиц) 40 чистых культур бактерий, способных развиваться на минеральной среде Петера с углеводородами в качестве источника углерода (различные бензины, Н-гексан, циклогексан). Изучение физиологических свойств и морфологии выделенных бактерий позволило автору отнести их к Pseudomonas putida и Pseudomonas fluorescens. Дальнейшее исследование свойств этих культур показало, что они способны развиваться и на других углеводородах, в частности на олефиновых соединениях, например 3-гексен, 2-гексен.

Снижение при этом иодных чисел, а также изменения величины pH (разные для опытов с мелом и без мела), по мнению автора, говорили о наличии окислительного процесса с образованием жирных кислот по следующему уравнению

$$\underset{\text{3-гексен}}{CH_3CH_2CH=CHCH_2CH_3}+2O_2=\underset{\text{пропионовая кислота}}{2CH_3CH_2COOH}$$

В некоторых опытах отмечалось увеличение иодных чисел, что являлось показателем возникновения новых двойных связей. Как предполагает автор, процесс в этом случае идет таким образом:

$$1.\ CH_3CH_2CH=CHCH_2CH_3+{}^1/_2O_2=CH_3CH=\underset{\text{2—4-гексадиен}}{CH-CH=CH-CH_3}+H_2O$$

$$2.\quad CH_3CH=CH-CH=CH-CH_3+4{}^1/_2O_2=2CH_3COOH+2CO_2+H_2O,$$

т. е. появляется промежуточный продукт с 2 двойными связями — 2—4-гексадиен.

Л. Осницкая

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Рубенчик Л. И. Сульфатредуцирующие бактерии. Изд-во АН СССР, М.—Л., 94 стр., 1947.

Книга Л. И. Рубенчик восполняет пробел в русской литературе — отсутствие монографии, посвященной бактериям, восстанавливающим сульфаты. Между тем эта группа бактерий играет выдающуюся роль в процессах превращения серы и углерода в природе и представляет большой интерес не только для микробиологов. С нею сталкиваются и биохимик и геолог, агроном и бальнеолог. Поэтому появление книги следует особенно приветствовать.

Монографию Л. И. Рубенчика можно разбить на четыре главы, которым автор предпосылает краткое введение. В конце книги приводится заключение и обширный список литературы.

Во введении автор кратко рассматривает восстановление сульфатов химическим и биологическим путем.

Исходя из современных положений термодинамики, автор приходит к заключению, что восстановление сульфатов при умеренных температурах возможно лишь микробиогенным путем при участии некоторых микробов.

С этим положением автора нельзя, конечно, не согласиться.

Краткое изложение истории возникновения проблемы микробиогенного восстановления сульфатов и истории открытия бактерий, восстанавливающих сульфаты, автор заканчивает словами: «Однако только после того, как Бейеринк (1895, 1896) и ван-Дельден (1904) обнаружили высокоактивные специализированные формы сульфатредуцирующих бактерий, была заложена основа всестороннего изучения микробиогенной редукции сульфатов в природе». Этот вывод является неправильным, так как методы получения культур бактерий, восстанавливающих сульфаты, впервые были разработаны Зелинским и Брусиловским в 1893 г. Если мы обратимся к составу среды, употреблявшейся названными авторами, то увидим, что она отличалась большей элективностью, чем среда Бейеринка и ван-Дельдена, так как она содержала азот в виде неорганического соединения (как известно, источником азота в среде Бейеринка и ван-Дельдена является аспарагин).

Первая глава книги, и самая большая (41 страница), посвящена анаэробным микроорганизмам, восстанавливающим сульфаты. Она включает анаэробных бактерий (разд. А, озаглавленный род Sporovibrio) и актиномицетов (разд. Б, с единственным представителем Actinomyces pelogenes).

Раздел А начинается с методики выделения и получения чистых культур бактерий. Далее следует морфология, цитология, культуральные особенности и питание этих микроорганизмов. Рассматривается биохимизм и энергетика процесса восстановления сульфатов, влияние различных экологических факторов, взаимоотношение сульфатредуцирующих бактерий с другими бактериями и их изменчивость под влиянием различных агентов (NaCl, температуры).

Вторая глава посвящена аэробным и факультативно-анаэробным микробам, восстанавливающим сульфаты. В этой главе автор дает описание микроорганизмов, выделенных различными авторами из рода Vibrio, Bacterium, Micrococcus и Bacillus.

В заключение излагаются мнения различных исследователей и взгляд самого автора на возможность восстановления сульфатов некоторыми неспецифическими микроорганизмами.

В третьей главе приводятся данные о распространении сульфатвосстанавливающих бактерий в природе: в озерах и лиманах, в реках, в водах и породах нефтяных месторождений, торфе и в сапропеле.

Книга заканчивается главой о значении сульфатредуцирующих бактерий в народном хозяйстве и в круговороте серы в природе.

В заключительном слове автор отмечает особенности бактерий из рода Sporovibrio и указывает на задачи, стоящие перед исследователями, изучающими этих бактерий.

Книга Л. И. Рубенчик, несмотря на небольшой объем, охватывает все основные достижения в области изучения бактерий, восстанавливающих сульфаты. Особенно ценен разносторонний подход автора к предмету исследования. Это дает возможность читателю ознакомиться с особенностями не только самих бактерий и биохимизмом и энергетикой процесса восстановления сульфатов, ими вызываемого, но и с многообразной ролью их как геохимических агентов. В этой книге найдут для себя материал

специалисты из разных областей науки. Несмотря на большие достоинства книги, нельзя не отметить ряд недостатков.

Прежде всего несколько слов о терминологии. На основании исследований американских ученых и, позднее, самого автора, описавших спорообразование у анаэробных бактерий, восстанавливающих сульфаты, автор относит их к роду Sporovibrio (родовое название предложено Starkey в 1938 г.). Между тем вопрос о спорообразовании у бактерий, восстанавливающих сульфаты, нельзя считать еще окончательно разрешенным (как на это указывают и другие авторы, например Имшенецкий). Действительно, превращение монотрихов в перитрихи в период спорообразования вызывает сомнение в правильности заключений. Между тем автор ставит этот новый термин как подзаголовок к первой главе, не освещая его с исторической точки зрения. Далее автор принимает видовые названия, предложенные Баарс (1930). В основу этой классификации положен физиологический признак — отношение к жирным кислотам: Vibrio desulfuricans не усваивает жирных кислот, Vibrio Rubentschikii усваивает (согласно Рубенчику, Sporovibrio desulfuricans и Sporovibrio Rubentschikii); оба вида идентичны морфологически. Эти новые термины автор распространяет на работы, появившиеся до 1930 г., и объединяет прежние виды Microspira desulfuricans и Microspira aestuarii в один вид Sporovibrio desulfuricans.

Между тем лишь немногие из прежних исследователей испытывали отношение бактерий, восстанавливающих сульфаты, к жирным кислотам. Такое изменение названий видов требовало бы пояснения если оно возможно вообще. Обращает на себя внимание также то обстоятельство, что автор нечетко разграничивает исследования различных ученых над чистыми культурами и над смешанными. Это особенно важно в таких вопросах, как питание бактерий и биохимизм процесса восстановления сульфатов, ими вызываемого. Рассматривая биохимизм процесса восстановления сульфатов, автор недостаточно также уделяет внимания роли водорода. Между тем русские ученые первые подняли вопрос о возможности восстановления сульфатов водородом под влиянием бактерий (Никитинский, Никлевский, 1914) и сделали наблюдения, указавшие на возможность этого процесса. Исследования американских ученых (Wight и Starkey, 1945) дают новые экспериментальные данные, подтверждающие мнение первых русских исследователей. Автор не приводит этой работы.

В главе, посвященной аэробным и факультативно-анаэробным микробам, Рубенчик дает описание этих микроорганизмов. К сожалению, автор не рассматривает методов работы и условий, при которых исследователи наблюдали восстановление сульфатов неспецифическими бактериями, что дало бы возможность оценить эти работы и составить представление о количественных показателях интенсивности этого процесса.

Л. Д. Штурм

Калиненко В. О. **Гетеротрофные бактерии в роли нитрификаторов.** Журнал «Почвоведение, № 6, 1948. Изд-во АН СССР.

В. О. Калиненко поставил перед собой весьма ответственную задачу — подвергнуть ревизии классические работы Виноградского и доказать, что процесс нитрификации вызывается не автотрофными микроорганизмами, а весьма разнообразными и неспецифическими сапрофитными бактериями. В выводах работы (п. 4) весьма определенно указывается, что автотрофные нитрификаторы в природе не существуют и окисление аммиака происходит лишь при наличии в среде органических соединений.

Помещая статью Калиненко, редакция журнала «Почвоведение» сочла необходимым сделать предисловие, в котором отметила, что экспериментальный материал автора далеко не достаточен и призвала микробиологов к тщательному и глубокому исследованию сообщаемых им выводов. Собственно говоря, этим предисловием выводы работы Калиненко взяты под сомнение, но, отвечая на призыв, мы займемся ниже анализом представлений, развиваемых в рецензируемой статье, с целью показать достаточно несерьезный характер выступления Калиненко.

Прежде всего следует отметить некоторые моменты, связанные с историей возникновения разбираемой проблемы.

Из изложения разбираемой статьи создается впечатление, что Калиненко впервые поднимает вопрос об образовании сапрофитными бактериями нитритов. Это отмечает в предисловии и журнал «Почвоведение». Так это дело может воспринять и читатель, плохо знакомый с литературой, ибо своих предшественников Калиненко отмечает весьма невразумительно, между тем по затрагиваемому вопросу имеется довольно большая русская и иностранная литература. В том числе и автор настоящей заметки, не считая себя пионером в затрагиваемом вопросе, в 1926—1928 гг. (т. е. 20 лет назад) написал две статьи с оригинальным экспериментальным материалом о роли сапрофитных бактерий в процессе образования нитритов. Совсем недавно в журнале «Микробиология» вопрос аналогичного же характера был обстоятельно разобран Нечаевой.

Калиненко замалчивает эти работы точно так же, как исследования Жолцинского, Рунова, Губина и значительную серию иностранных публикаций.

Как же можно оценить выступление Калиненко, учитывая ранее выполненные работы и его «новые» данные, которые собственно ничего нового к давно известным фактам не добавляют?

Прежде всего встает вопрос, удалось ли кому-нибудь поставить под сомнение существование автотрофных нитрифицирующих бактерий? Анализ классических работ Виноградского, исследований Мейергофа, Квестеля и опыт большого ряда других микробиологов ставит вне всякого сомнения утвердившийся в микробиологии взгляд на возбудителей нитрификационного процесса. Автор настоящей заметки, подобно ряду других микробиологов, имел чистые культуры бактерий, описанных Виноградским. Их выделение требует определенного искусства в микробиологических исследованиях, отсутствие которого не может опровергнуть ни в какой мере классические работы Виноградского.

Собственно говоря, из статьи Калиненко ясно, что с автотрофными нитрификаторами он не работал, не справившись с выделением чистых культур, поэтому все заключения по данной группе микроорганизмов сделаны им без всяких оснований.

Можно отметить, что если бы Калиненко проследил лишь за динамикой органического вещества в элективных средах для нитрификаторов, то он легко убедился бы в его нарастании с течением времени. Это вполне понятное явление, свидетельствующее об автотрофном питании нитрификаторов, делает возможным развитие в среде некоторых сапрофитов. Данный факт, чрезвычайно смущающий Калиненко, на самом деле подтверждает теорию Виноградского, а не опровергает ее.

Своеобразие представлений Калиненко о нитрификаторах видно из сообщаемых им на стр. 357 сведений о том, что автотрофные нитрификаторы должны жить «извлекая энергию аммония». Это утверждение выглядит странно и, выражаясь языком журнала «Почвоведение», требует тщательного и глубокого исследования.

Таким образом, Калиненко совершенно необоснованно в рецензируемой статье коснулся автотрофных бактерий, спутав вопрос об их существовании с другим принциально интересным вопросом о возможной роли сапрофитов в процессе нитрификации.

К настоящему времени накопилось достаточно фактов, говорящих о возможности окисления в лабораторной обстановке солей аммония в нитриты под влиянием фотоэнергии и при работе некоторых гетеротрофных бактерий. Возможно, что и в природе под влиянием данных факторов могут образоваться в некоторых случаях соли азотистой кислоты.

Единичные утверждения о том, что при подобных процессах образуются соли азотной кислоты, нельзя считать сколь-либо основательно экспериментально обоснованными. Между прочим Калиненко умалчивает о своих представлениях относительно второй стадии нитрификационного процесса. Изученные им бактерии не только окисляют соли аммония, но восстанавливают соли азотной кислоты до нитритов, и поэтому их никак нельзя отнести к полноценным заменителям автотрофных нитрификаторов. Аналогичным же свойством обладали и другие описанные к настоящему времени гетеротрофные бактерии, образующие азотистую кислоту (см. работы Мишустина, Рунова, Кампбелла и др.).

Таким образом, на отмеченном, довольно скользком для себя вопросе Калиненко старается не задерживаться.

В общем факты, сообщаемые Калиненко об образовании некоторыми сапрофитными бактериями нитритов, не противоречат литературным данным. Однако они, как уже отмечалось, принципиально нового ничего не дают. Вместе с тем нужно категорически отметить, что удельный вес окисления аммиака в нитриты сапрофитами не должен переоцениваться. В свое время нами было отмечено, что сапрофитные бактерии накапливают в среде крайне небольшое количество нитритов и поэтому основная роль в нитрификационном процессе принадлежит автотрофным бактериям, для которых данный процесс является жизненно необходимым, а не побочным, как это имеет место в первом случае.

Скудные фактические данные, сообщаемые в работе Калиненко, по существу подтверждают наш вывод. Так, из табл. 2 видно, что из имевшихся в среде 400 мг аммиака образовалось лишь около 3 мг нитритов. В табл. 1 приводятся несколько бо́льшие цифры, но и там к концу опыта в среде имелось лишь около 20 мг нитритов на 1 л среды. В то же время автотрофные нитрификаторы накапливают на 1 л среды до 500—1000 мг и более нитритов. Приведенные цифры дают возможность сравнить относительную энергию разбираемых процессов. Это сравнение не свидетельствует в пользу представлений Калиненко.

Таким образом, можно говорить о слабой способности некоторых сапрофитных бактерий к окислению аммиака в нитриты, но подобные формы не могут быть названы нитрификаторами. Последнее понятие приурочено к хорошо в физиологическом отношении очерченной группе микробов.

Очевидно, Калиненко не известно, что весьма многие специфические процессы в слабой степени могут вызываться разнообразными микроорганизмами. Так, атмосферный азот до некоторой степени фиксируется грибами, актиномицетами и другими микробами. Мочевина может разлагаться не только уробактериями и т. д. Однако такие дав-

но известные факты никогда и никому не давали повода для утверждения, что физиологическая группировка микробов является абсурдом.

В заключение мы должны отметить, что в своей статье Калиненко совершенно ничего не говорит о методике, принятой им при постановке опытов. Это весьма досадно и лишает сообщаемый материал какой бы то ни было достоверности. При работе с бактериями, редуцирующими нитраты, небольшие количества соединений азотистой кислоты могут получиться из весьма обычных загрязнений реактивов нитратами. Поэтому эксперименты, подобные приведенным Калиненко, должны ставиться с тщательно очищенными солями, многократно перегнанной водой и в токе очищенного воздуха (во избежание аккумуляции нитритов, имеющихся в лабораторном воздухе). Неизвестно, были ли соблюдены все эти предосторожности. Возможно, что и нет, так как в некоторых случаях отмечалось развитие чистых культур сапрофитных «нитрификаторов» в минеральной среде Виноградского. Это обстоятельство может быть объяснено лишь загрязнениями питательных сред.

Наука, развивающаяся на принципах диалектического материализма, борется с канонизацией утвердившихся взглядов. Это обеспечивает прогресс и характеризует качество подлинной науки, служащей на благо социалистическому обществу.

Однако построение здания науки должно закладываться на прочном теоретическом фундаменте, подтвержденном экспериментом. Рассмотренный нами случай со статьей Калиненко не может быть отнесен к числу прогрессивных явлений и должен быть оценен как проявление крайне легкого отношения к завоеваниям русской науки. Нам остается совершенно непонятной та старательность, с которой Калиненко уже не первый раз пытается дискредитировать классическое учение об автотрофии.

К сожалению, Калиненко не счел нужным посчитаться с замечаниями, сделанными ему при докладе в Институте микробиологии АН СССР, и, вместо доработки своего материалы, напечатал его в журнале «Почвоведение» в весьма неудовлетворительном состоянии.

Е. Мишустин

СОДЕРЖАНИЕ XVII ТОМА

	Стр.
Авдиевич Н. М. см. Имшенецкий А. А.	6—463
Алеев Б. С. Еременко К. Ф. и Фридман И. М. Плесневение кинофильмов	6—469
Алпатов В. В. см. Настюкова О. К.	1—42
Аношкина А. А. см. Паллади на О. К.	— 4—269
Аристовская Т. В. О ферментативной активности северных рас микроорганизмов	5—350
Баринова С. А. Влияние калия и магния на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию	1—10
Билай В. И. Действие экстрактов токсических грибов на животные и растительные ткани	2—142
Бирюзова В. М. см. Крисс А. Е.	6—484
Блинков Г. Н. Влияние реакции среды на интенсивность азотфиксации и рост азотобактера	1—49
Возняковская Ю. М. Роль Clostridium Pasteurianum, как фактора, повышающего эффективность бактеризации семян азотобактером	5—389
Возняковская Ю. М. Влияние корневой системы пшеницы на микрофлору почвы	6—458
Воронина Л. И. см. Мизин П. Я.	1—87
Воронкевич И. В. Выживаемость возбудителя слизистого бактериоза капусты Erwinia aroidae (Tows) Holland в почве	1—91
Гамалея Н. Ф. (Рыжков В. Л.)	3—282
Гамова-Каюкова Н. И. Метод получения сухих культур молочнокислых бактерий с применением «ростовых веществ» и сушки в вакууме при низких температурах	1—66
Гамова-Каюкова Н. И. и Федорова Т. М. Proteus и распространение его в природе	5—380
Гибшман М. Р. Изменчивость молочнокислых стрептококков. 1. Диссоциация гетероферментативных стрептококков	4—279
Гольдин М. И. О реакции петуньи на вирус мозаики помидоров	4—290
Гольдин М. И. Спецефичность вирусных нитевидных включений	5—395
Горюнова С. В. Растворенные органические вещества в открытых водоемах	3—271
Горюнова С. В. Получение бактериологически чистых культур водорослей при помощи комбинированных сред	4—243
Горюнова С. В. Культивирование водорослей в лабораторных условиях (обзор)	5—402
Диденко С. И. см. Крисс А. Е.	4—233
Дикасова Е. Т. Серодиагностика вируса желтухи тутового шелкопряда	2—189
Евреинова Т. Н. Аминокислотный состав белка, выделенного из термофильных бактерий	1—25
Еременко К. Ф. см. Алеев Б. С.	6—469
Замков В. А. Простое приспособление для флуоресцентной микроскопии	5—400
Золковер А. М. см. Крисс А. Е.	6—484
Имшенецкий А. А. Об артефактах, принятых за ядра у бактерий	3—218
Имшенецкий А. А. и Авдиевич Н. М. Адсорбция мелом бактериальных ферментов	6—463
Исаченко Б. Л. О биогенном образовании карбоната кальция	2—118
Канунникова З. А. Изменение физиологической активности Bact. Delbrückii	4—251
Карпенко М. К. см. Френкель Г. М.	6—435
Клейн Б. И. и Шур-Шульц В. Н. Влияние бактериофага на ферментативные системы бактериальной клетки	4—229
Корсакова М. П. Денитрифицирующие бактерии (обзор)	6—488
Красильников Н. А. О классификации бактерий	2—105
Крисс А. Е., Бирюзова В. М. и Золковер А. М. Капельный диализ — метод приготовления биологических препаратов для электронной микроскопии	6—484
Крисс А. Е. и Рукина Е. А. О природе бактериофага. II. Очищенный бактериофаг и его свойства	2—176
Крисс А. Е. и Рукина Е. А. О природе бактериофага. III. Роль защитных коллоидов в сохранении устойчивости бактериофага при денатурирующих воздействиях	3—240

	Стр.
Крисс А. Е., Диденко С. И. и Стрельцова Е. А. О природе бактериофага. IV. Литическая активность бактериофага, как показатель состояния корпускула	4—233
Крисс А. Е. О природе бактериофага. V. Гипотеза о строении бактериофага	5—340
Крицкая Н. Н. О токсичности среды Вильсон — Блера для анаэробов	1—82
Кротова Т. А. см. Палладина О. К.	4—269
Крупин Н. В. Влияние грамицидина С на морфологию и физиологию микробов. I. Влияние грамицидина С на морфологию стафилококков и картофельной палочки	3—263
Крупин Н. В. II. Влияние грамицидина С на пигментообразование у стафилококков	4—248
Крупин Н. В. III. Влияние грамицидина С на дыхание бактерий	5—371
Кузнецов С. И. Проблема автотрофии у микроорганизмов (обзор)	4—307
Липшиц В. В. см. Френкель Г. М.	6—435
Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Брожение, вызываемое дрожжами, адаптированными к высокой температуре	1—15
Мазюкевич В. А. см. Палладина О. К.	4—269
Медвинская Л. Ю. и Рождественский В. С. Споровая эпифитная микрофлора зерна пшеницы	2—148
Мессинева М. А. Биохимические процессы в грязевых вулканах «Ахтанизовские Блевако»	1—54
Мессинева М. А. Характеристика микрофлоры соленоводных водоемов Таманского полуострова	2—153
Мизин П. Я. и Воронина Л. И. Консервирование клеёв антисептиками	1—87
Мишустин Е. Н. О роли спороносных бактерий в почвенных процессах	3—201
Мишустин Е. Н. и Теппер Е. З. Описание нового вида бактерий Bac. longissimus nov. sp.	6—413
Настюкова О. К. и Алпатов В. В. Об экологии и физиологии лево- и правозавитых форм Bac. mycoides (Flügge)	1—42
Нахимовская М. И. Pseudomonas aurantiaca nov. sp.	1—58
Нехотенова Е. И. см. Пешков М. А.	3—229
Николаевская М. А. см. Частухин В. Я.	1—3
Новогрудский Д. М. Об одном проявлении антимикробных свойств почвы	3—193
Новогрудский Д. М. О расселении почвенных бактерий по гифам грибов	1—28
Палладина О. К., Кротова Т. А., Мазюкевич В. А. и Аношкина А. А. Нормальная ацидофильная флора кишечника, сбраживающая крахмал	4—269
Париевская А. П. Вирусное заболевание декоративных растений (мозаичное заболевание Pelargonium sp.)	5—376
Пешков М. А. и Нехотеннва Е. И. Цитологические особенности diphtheriae Park Williams № 8 при росте на бульоне	3—229
Пиковская Р. И. Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов	5—362
Раутенштейн Я. И. За передовую Мичуринскую биологическую науку	5—329
Родигин М. Н. О распространении Gloeosporium lagenarium (Pass.) Sacc. et Roum. воздушными течениями	5—355
Родина А. Г. Бактерии как пища для пресноводных моллюсков	3—232
Рождественский В. С. См. Медвинская Л. Ю.	2—148
Романкова А. Г. Антагонизм между плесневыми грибами	2—132
Рукина Е. А. см. Крисс А. Е.	2—176
Рыжков В. Л. и Смирнова В. А. Влияние катионов на некротическую реакцию у Nicotiana glutinosa	3—240
Рыжков В. Л. и Смирнова В. А. Действие ионов магния и акридиновых препаратов на накопление вирусного белка мозаичной болезни табака	1—96
Славнина Г. П. Применение флуоресцентного метода для исследования некоторых видов бактерий, окисляющих углеводороды	3—267
Смирнова А. Э. Быстрый мемето контроля над нарастанием дрожжевой массы в процессе брожения	1—76
Смирнова В. А. см. Рыжкова В. Л.	2—171
Соболь С. Л. Мартын Терехов-	1—96
ский (1740—1796) и его диссертация о природе наливочных анималькулей	3—267
Старыгина Л. П. и Шишелова Н. А. Возбудители мягкой гнили семенников капусты	4—294
Стрельцова Е. А. см. Крисс А. Е.	2—160
Таусон Т. А. О влиянии стеринов на жизнедеятельность мик-	4—23

Стр.

роорганизмов. 1. О физиологическом значении эргостерина для дрожжей и эндомицетов 2—126
Таусон Т. А. см. Шапошников В. Н. . . . . 6—419
Теппер Е. З. см. Мишустин Е. Н. . . . . 6—413
Федоров М. В. О значении водорода, непосредственно связанного с углеродным атомом, в фиксации молекулярного азота азотобактером . . . . . 3—208
Федоров М. В. Фиксация молекулярного азота азотобактером в присутствии амидо- и аминокислот . . . . . 6—425
Федоров Т. М. см. Гамова-Каюкова Н. И. . . . . 5—380
Френкель Г. М., Липшиц В. В. и Карпенко М. К. Дегидрирование некоторых субстратов ослабленными формами Cl. Welchii Holland . . . . . 6—435
Фридман И. М. см. Алеев Б. С. . . . . 6—469
Халабуда Т. В. Результаты исследований микрофлоры почв . 4—257
Частухин В. Я. и Николаевская М. А. Исследования по экологии грибов, образующих антибиотические вещества . . . . . 1—3
Чумак М. Д. Ацетоно-этиловые бактерии. IV. Изменчивость ацетоно-этиловых бактерий . . 1—36
Шапошников В. Н. и Таусон Т. А. Некоторые данные по биохимической характеристике протеинобактерий . . . 6—419

Стр.

Шишелова Н. А. Роль протопектиназы в инфекционном процессе у растений . . . . . 3—252
Шишелова Н. А. см. Старыгина Л. П. . . . . 2—160
Штерн Е. А. Серологическая характеристика азотобактера . 6—445
Штурм Л. Д. Морфологические и культуральные признаки факультативно-аэробных бактерий, восстанавливающих сульфаты . . . . . 5—334
Штурм Л. Д. Восстановление сульфатов факультативно-аэробными бактериями . . . . 6—415
Шумаков А. М. Дрожжевая микрофлора виноградной ягоды 6—452
Шур-Шульц В. Н. см. Клейн Б. И. . . . . 4—229
Экзерцев В. А. Определение мощности микробиологически-активного слоя иловых отложений некоторых озер . . . 6—476
Ярмола Г. А. Ацетоно-этиловое брожение. Зависимость выходов ацетона и этилового спирта от концентрации сахаров в среде . . . . . 6—471

Рефераты . . . . . 1—100
2—192
3—283
4—319
5—409
6—502
Критика и библография . 3—284
6—506
Хроника . . . . . 3—287
4—323

СОДЕРЖАНИЕ

Б. Л. Исаченко (некролог)
Е. Н. Мишустин и Е. З. Теппер. Описание нового вида бактерии Bac. longissimus 413
Л. Д. Штурм. Восстановление сульфатов факультативно-аэробными бактериями 415
В. М. Шапошников и Т. А. Таусон. Некоторые данные по биохимической характеристике протеинобактерий 419
М. В. Федоров. Фиксация молекулярного азота азотобактером в присутствии амидо- и аминокислот 425
Г. М. Френкель, В. В. Липшиц и М. К. Карпенко. Дегидрирование некоторых органических субстратов ослабленными формами Cl. Welchii Holland 435
Е. А. Штерн. Серологическая характеристика азотобактера 445
А. М. Шумаков. Дрожжевая микрофлора виноградной ягоды 452
Ю. М. Возняковская. Влияние корневой системы пшеницы на микрофлору почвы 458
А. А. Имшенецкий и Н. М. Авдиевич. Адсорбция мелом бактериальных ферментов 463
Б. С. Алеев, К. Ф. Еременко и И. М. Фридман. Плесневение кинофильмов 469
Г. А. Ярмола. Ацетоно-этиловое брожение. Зависимость выходов ацетона и этилового спирта от концентрации сахаров в среде 471
В. А. Экзерцев. Определение мощности микробиологически активного слоя иловых отложений некоторых озер 476
А. Е. Крисс, В. И. Бирюзова и А. М. Золковер. Капельный диализ—метод приготовления биологических препаратов для электронной микроскопии 484
М. П. Корсакова. Денитрифицирующие бактерии (Обзор) 488
Рефераты 502
Критика и библиография 506

А 11233 Подписано к печати 22. XI. 1948 г. Печ. л. 6½+1 вклейка
Уч.-изд. л. 10 Тираж 3450 экз. Заказ 1618

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10.

Цена 9 руб.

ОТКРЫТА ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛЫ АКАДЕМИИ НАУК СССР НА 1949 ГОД

НАЗВАНИЕ ЖУРНАЛА	Колич. номеров в год	Подписная цена на год (в руб.)
Автоматика и телемеханика	6	45
Астрономический журнал	6	36
Биохимия	6	54
Ботанический журнал СССР	6	63
Вестник Академии Наук СССР	12	96
Вестник древней истории	4	120
Доклады Академии Наук СССР (без переплета)	36	360
Доклады Академии Наук СССР с 6-ю папками (коленкоровыми, с тиснением) для переплета		385
Журнал аналитической химии	6	36
Журнал экспериментальной и теоретической физики	12	108
Журнал физической химии	12	144
Журнал общей химии	12	180
Журнал общей биологии	6	45
Журнал прикладной химии	12	126
Журнал технической физики	12	144
Зоологический журнал	6	54
Записки Всесоюзного минералогического общества	4	30
Известия АН СССР, серия биологическая	6	72
Известия АН СССР, серия геологическая	6	90
Известия АН СССР, серия географическая и геофизическая	6	54
Известия АН СССР, серия истории и философии	6	54
Известия АН СССР, Отделение литературы и языка	6	54
Известия АН СССР, серия математическая	6	54
Известия АН СССР, Отделение технических наук	12	180
Известия АН СССР, серия физическая	6	72
Известия АН СССР, Отделение химических наук	6	63
Известия АН СССР, Отделение экономики и права	6	45
Известия Всесоюзного географического общества	6	63
Коллоидный журнал	6	45
Микробиология	6	54
Математический сборник	6	90
Почвоведение	12	72
Прикладная математика и механика	6	63
Природа	12	72
Советское государство и право	12	108
Советская этнография	4	90
Успехи современной биологии	6	60
Успехи химии	6	48
Физиологический журнал СССР имени Сеченова	6	72

Подписка принимается:

Во всех конторах «Союзпечати» и почтовых отделениях.

В магазинах «Академкнига»; в Москве — *Пушкинская, 23 и ул. Горького, 6;* в Ленинграде — *Литейный пр., 53-а;* в Свердловске — *ул. Малышева, 58;* в Ташкенте — *ул. Карла Маркса, 29;* в Киеве — *Б. Владимирская, 53.*